

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C12N 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/05457
		(43) 国際公開日 1995年2月23日 (23.02.95)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01352 (22) 国際出願日 1994年8月16日 (16. 08. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/226454 1993年8月19日 (19. 08. 93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 日吉 徹 (HI YOSHI, Toru) [JP/JP] 畠 利喜 (MINE, Toshiki) [JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡磐田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) 笠岡啓介 (KASAKO, Keisuke) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 日本たばこ産業株式会社 アグリ事業部内 Tokyo, (JP) タイソン ヒュー ロバート (TYSON, Huw Robert) [GB/GB] ペイジ マイルズ ジョン アンソニー (PAGE, Miles John Anthony) [GB/GB] シーピー 2 4エージー ケンブリッジ ベイブラハム アクシス ジェネティックス リミテッド内 Cambridge, (GB)</p>		
<p>(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 國際調査報告書</p>		
<p>(54) Title : DNA CODING FOR PLANT-DERIVED ATP-DEPENDENT FRUCTOSE-6-PHOSPHATE 1-PHOSPHOTRANSFERASE, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING THE SAME, AND METHOD OF CHANGING SUGAR CONTENT OF PLANT CELL BY USING THE VECTOR AT LOW TEMPERATURE</p> <p>(54) 発明の名称 植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスクレオチダーゼをコードするDNA、それを含む組換えベクター及びそれを用いる低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法</p>		
<p>RB, LB ... right and left boundary regions of T-DNA of <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>nosP ... promoter of nopaline synthase gene of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (0.3 kb)</p> <p>NPTII ... neomycin phosphotransferase gene imparting kanamycin resistance (1.2 kb)</p> <p>nosT ... polyadenylation signal of nopaline synthase of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (0.3 kb)</p> <p>CaMV 3SS ... 3SS promoter of cauliflower mosaic virus (0.8 kb)</p> <p>PFKd ... cold-resistant PFK gene of potato "Brodick" (1.8 kb)</p> <p>RB, LB: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのT-DNAの左右境界領域 nosP: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリンシンターゼ遺伝子のプロモーター (0.3 kb) NPTII: カナマイシン抵抗性を与えるネオマイシンホスホトランスクレオチダーゼ遺伝子 (1.2 kb) nosT: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリンシンターゼのポリアデニレーションシグナル (0.3 kb) CaMV 3SS: カリフラワーモザイクウイルスの3SSプロモーター (0.8 kb) PFKd: バレシ・品種Brodickの低温耐性PFK遺伝子 (1.8 kb)</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention discloses a DNA coding for a cold-resistant PFK, a recombinant vector capable of expressing a cold-resistant PFK in a host cell, and a method of changing the sugar content of a plant cell by using the vector at low temperature. The invention provides a DNA coding for a plant-derived ATP-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, a recombinant vector containing the DNA and capable of expressing a plant-derived ATP-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in a plant cell, and a method of changing the sugar content of a plant cell at low temperature by transforming a plant with the vector.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

低温耐性P F KをコードするD N A、低温耐性P F Kを宿主細胞内で発現することができる組換えベクター及び該組換えベクターを用いて低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法が開示されている。本発明は、植物由来のA T P依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするD N A、該D N Aを含み、宿主細胞内で植物由来のA T P依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼを発現することができる組換えベクター、及び該組換えベクターで植物を形質転換することから成る、低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法を提供した。

情報としての用途のみ

P C Tに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にP C T加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	L I	リヒテンシュタイン	P T	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	L K	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	L R	リベリア	KU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FIR	フィンランド	L T	リトアニア	SD	スードン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BFF	ブルガニア・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	I E	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴー	I T	イタリー	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	J P	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
C I	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	K P	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	N Z	ニュー・ジーランド	VN	ヴィエトナム

明細書

植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするDNA、それを含む組換えベクター及びそれを用いる低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法

技術分野

本発明は、植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼ(EC 2.7.1.11) (以下、「PFK」という) をコードするDNA、それを含む組換えベクター及び該組換えベクターを用いて低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法に関する。

背景技術

PFKは、解糖系の律速反応を触媒し、フルクトース6リン酸(以下F6Pと称する)をフルクトース1, 6二リン酸にリン酸化する酵素である。

植物組織を低温下に晒すと一般にスクロース、グルコース、フルクトース等の糖含量が増加することが知られている。例えば、バレイショ塊茎もその例外ではないが、塊茎低温貯蔵中に生じるグルコース、フルクトースといった還元糖の蓄積はポテトチップ加工時の過度の褐変の原因になり産業上好ましくない。この還元糖蓄積が生じる原因については様々な仮説があるが、低温下では解糖系活性が著しく低下し、その結果、テンプン分解物のスクロース合成系側への流入が促進され、それが原因で還元糖が蓄積すると考えられている。解糖系はPFKによって律速され、且つPFKは低温に弱い酵素であることが広く知られていることから、低温下における解糖系活性の著しい低下の原因是、PFKの著しい活性低下に起因すると考えられている。

PFK遺伝子単離に関しては、大腸菌、好熱菌、枯草菌及びマイコプラズマ等の原核生物由来のもの並びにヒト筋肉、ヒト肝臓、ウサギ筋肉及びマウス肝臓等の真核生物組織由来のものが論文で報告されている。しかしながら植物PFK遺伝子の単離報告はない。また低温耐性PFKをコードしている遺伝子を単離したという報告もない。それ故、従来技術では、低温耐性PFK遺伝子導入による低温低糖性バレイショの作出、あるいはPFKアンチセンスRNAを発現させ植物組織内の解糖系活性を抑制することによって、糖含量の高い新しい味覚を有する

作物を作出することができない。

植物に PFK 遺伝子を導入した例として欧州特許公開第 0 438 904号（特開平 4-341126 号公報）がある。この公開公報に記載された発明では、大腸菌 PFK 遺伝子をバレイショ、イネで発現させ、糖代謝系の中間代謝物量に変化が生じることを示した。特に、バレイショでは収穫直後の塊茎中のスクロース含量が減少することを示した。しかし、この公報記載の発明では、加工用バレイショで産業上問題となる低温貯蔵下の塊茎中のグルコース、フルクトース量の減少については述べられていない。大腸菌 PFK が低温下で不安定な酵素であること (Kruger, N. J. (1989) Biochemical Society Transaction 629th Meeting, London Vol. 17 760-761) を考慮すれば、大腸菌 PFK 遺伝子をバレイショに導入し、塊茎で発現させる方法では低温低糖性バレイショ品種を作出できることは容易に想像が付く。本目的を達成するには低温耐性 PFK をコードする遺伝子が必要である。しかし、低温耐性 PFK 遺伝子を単離したという従来技術はない。

収穫後のバレイショ塊茎を低温貯蔵することは、病気、発芽、老化を抑制し長期保存するうえで非常に重要である。しかし、低温貯蔵した塊茎をポテトチップやフレンチフライの原料として直接使用する場合、加工中に過度の褐変を生じ製品（特にポテトチップ）の商品価値が著しく低下する。この褐変は、塊茎中に含まれるアミノ酸と還元糖が高温の油で加工する際に生じるメイラード反応によって起こることが知られている (Schallenger, R. S. et al., (1959) J. Agric. Fd Chem., 7, 274)。塊茎を低温貯蔵すると塊茎中の還元糖（グルコース・フルクトース）量が増加し、塊茎中のグルコース・フルクトース量と製品の褐変度の間に高い相関が見られることが知られており、低温貯蔵中のグルコース・フルクトース量の増加が、加工中に過度の褐変を生じる主要因と考えられている (Gray, D and Hughes, J. C. (1978) The Potato Crop (ed. P. M. Harris), Chapman & Hall, London, pp. 504-544)。

現在、ポテトチップ加工業者は発芽抑制剤を併用し 8 °C 前後（品種により異なる）の低温で貯蔵した塊茎を原料として用いている。しかし、許容範囲を越える還元糖の蓄積があり、加工前にブランチングあるいはリコンディショニングと呼ばれる処理をし、塊茎組織の還元糖量を減らしてから使用している。これらの処

理は費用や手間が掛かり、現在使用されている貯蔵温度で還元糖を蓄積しないバレイショ新品種が作出されれば、それは加工業者にとってコスト低減につながるという利点がある。さらに、2~4°Cという低温貯蔵下で還元糖を蓄積しにくいバレイショ品種を作出できれば、プランチングやリコンディショニングといった加工前処理に費やす手間や費用を節減できるだけではなく、老化あるいは乾物重ロスの原因となる発芽を抑制でき、安全性に問題のある発芽抑制剤を使用せずに塊茎の長期保存が可能になる。こうした意味で低温低糖性のバレイショ品種の作出に対する加工業者の要求は強い。

この問題となる低温貯蔵中のグルコース・フルクトース量の増加は、低温下での塊茎中の様々な生理的変化により生じるが、そのなかでも、解糖系の律速酵素と言われるPFKの低温下での著しい活性低下が主要な原因であると考えられている (Dixson, W. L. and ap Rees, T. (1980) *Phytochem.*, 19, 1653; Dixson, W. L. et al., (1981) *Phytochem.*, 20, 969; Pollock, C. J. and ap Rees, T. (1975) *Phytochem.*, 14, 613)。低温貯蔵中の塊茎では、還元糖はデンプンの分解により供給されると考えられ、その代謝過程でF6Pを経由する。F6Pを基質とする生体反応には大きく分けて2つある。1つはF6Pを解糖系へ流すPFKに触媒される反応、もう1つはF6Pをスクロース合成系へ流すスクロース6リン酸合成酵素(以下SPSと称する)(EC. 2.4.1.14)に触媒される反応である。つまりこの2酵素は基質のF6Pを巡って競合関係にある。収穫後常温で貯蔵したバレイショ塊茎では、発芽や老化を起こさない限り通常グルコースとフルクトースの蓄積量は非常に少ない。これはPFKがSPSとの競合で勝り、F6Pの大部分が解糖系側に流れ込むためと考えられる。しかし、低温下ではPFKの酵素活性が著しく低下し、SPSがPFKとの競合に勝り、F6Pは解糖系よりもスクロース合成系に優先的に流れ込むようになる。そしてスクロースは最終的にインペルターゼ(EC. 3.2.1.26)の働きによってグルコースとフルクトースになり蓄積すると考えられている。このようにPFKの活性低下に起因する解糖系活性の減少が、低温貯蔵中にバレイショ塊茎中のグルコースとフルクトース量を増加させる原因と考えられている。この仮説を裏付けるように、Hammond等(*Planta* 180, 613-616. 1990)は、スコットランド作物研究所で作出された低

温低糖性品種の塊茎には低温貯蔵中に還元糖含量が増加する通常品種にはない低温耐性P F Kが存在することを報告しており、塊茎中のP F Kの低温耐性の強弱が低温貯蔵中のグルコース、フルクトース量を決定する主要因である可能性が示されている。

もし、低温耐性P F KをコードするDNAが得られれば、それをバレイショに導入し低温貯蔵中の塊茎で発現させることにより解糖系活性を高めることができ、その結果、還元糖量の少ない低温低糖性バレイショを作出できる。これにより、加工業者は糖含量を低下させるために現在行っているプランチングやリコンディショニング処理に費やしているコストを節約できる。

発明の開示

従って、本発明の目的は、低温耐性P F KをコードするDNAを提供することである。さらにまた、本発明の目的は、低温耐性P F Kを宿主細胞内で発現することができる組換えベクターを提供することである。さらに、本発明の目的は、該組換えベクターを用いて植物を形質転換することにより低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法を提供することである。

本願発明者らは、上記目的を達成するために、低温耐性P F Kを有する植物組織、具体的にはバレイショ品種Brodickの塊茎に由来するP F Kのアイソザイムの1つをコードする相補的遺伝子(cDNA、翻訳領域及び非翻訳領域を含む)の単離並びに構造解明を試みた結果、これに成功し、且つ本遺伝子が大腸菌およびバレイショ塊茎中で低温耐性P F Kを発現させることを確認し、且つ本遺伝子を発現させたバレイショの低温貯蔵塊茎中のグルコース含量の減少およびそれを材料として調製したポテトチップの色の改善を確認し、且つ本遺伝子をプローブとして種々植物P F K遺伝子の単離に成功し、且つ種々植物P F Kに特異的で且つ共通に存在するアミノ酸配列を同定し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、植物由来のP F KをコードするDNAを提供する。また、本発明は、上記本発明のDNAを含み、宿主細胞内で配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、上記本発明の組換えベクターで植物を形質転換することから成る、低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法を提供す

る。さらに、本発明は、配列表の配列番号 11、14、21 又は 22 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA を提供する。さらにまた、本発明は、配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸又はその部分をコードする DNA 及び配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA を含む DNA のいずれかと試料 DNA とをハイブリダイズさせることから成る、植物由来の PFK 遺伝子の検出方法を提供する。さらにまた、本発明は、配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸又はその部分をコードする DNA 及び配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA を含む DNA のいずれかを PCR のためのプライマーとして用いて植物由来の ATP 依存フルクトース 6 リン酸 1 ホスホトランスフェラーゼ遺伝子を增幅する方法を提供する。

本発明により、低温耐性 PFK をコードする DNA およびそれを含むベクターが初めて提供された。本発明の組換えベクターを植物に遺伝子工学的に導入し発現させることにより、低温下に置かれた塊茎組織でグルコース含量を非形質転換体に比べ減少させることが可能であり、特に植物、その中でもバレイショで低温低糖性品種の開発に利用できる。また、本発明により初めて提供された種々植物 PFK 遺伝子の DNA 塩基配列は、植物 PFK 遺伝子の単離にプローブとして利用するのが非常に難しい他生物由来の PFK 遺伝子と異なり、植物 PFK 遺伝子単離に広く利用できる。さらに、単離された種々植物 PFK 遺伝子の塩基配列を利用して、アンチセンス RNA を発現させる方法等により、植物細胞中の PFK 活性を抑制することが可能になる。例えば糖代謝を改変したり、呼吸を減少させることができ、より多く糖を蓄積する甘い果物や野菜を作出できる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の組換えベクターで形質転換された大腸菌 No. 58 株と、対照の大腸菌 No. 1 株の IPTG 添加後における PFK 活性の誘導の時間変化を示す図である。

図 2 は、本発明の組換えベクターで形質転換された大腸菌 No. 58 株の PFK 活性の免疫滴定実験の結果を示す図である。

図 3 は、本発明の組換えベクターで形質転換された大腸菌 No. 58 株から精製し

たP F KのS D S - P A G Eによる解析とウェスタンプロット解析の結果を示す図である。

図4は、低温耐性P F K-d遺伝子を含む発現ベクターを示す図である。

図5は、系統B 7 5及び系統B 4 0の貯蔵塊茎からのR N Aのノーザンプロット分析の結果を示す図である。

図6は、系統B 7 5及び系統B 4 0の貯蔵塊茎からの粗抽出液のウェスタンプロット分析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

上述のように、D N Aは植物P F Kをコードするものであり、その具体例であるバレイショ (*Solanum tuberosum L.*)、フラベリア (*Flabertia brownii*)、イネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ラディッシュ (*Raphanus sativus*) P F KコードD N Aは、各々下記配列表の配列番号2、4、6、8、10で示されるアミノ酸配列をコードする。このようなD N Aの具体例として、下記実施例において実際にクローニングされ、塩基配列が決定された、配列表の配列番号1、3、5、7、9で示されるD N Aを挙げることができるがこれに限定されるものではない（なお、配列番号2、4、6、8、10のアミノ酸配列は各々配列番号1、3、5、7、9に示されているアミノ酸配列と同じである）。特に、配列番号1、3、5、7、9で示されるものはc D N Aであるが、本発明により、植物P F Kのアミノ酸配列及びこれをコードするD N Aの塩基配列が明らかにされたので、これらの塩基配列の両端部分をプライマーとして用い、ゲノミックD N Aを鑄型として用いたP C R法により、配列番号2、4、6、8、10で示されるアミノ酸配列をコードするゲノミックD N Aを容易に調製することができる。従って、このようなゲノミックD N A（イントロン部分を含み得る）も本発明の範囲に入るものと解釈する。

上記した、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするD N Aや、配列番号1で示される塩基配列を有するD N Aがコードする植物P F Kは、後述の実施例で具体的に示されるように、5°CにおけるQ10値（後述）が2.4以下である。5°CにおいてQ10値が2.4以下であるP F Kは低温耐性を有すると言える。

本発明のDNAは、例えば次のような方法により得ることができる。

まず、植物組織よりPFKに対応するポリ(A)+RNAを分離する際には、まず分解を受けていない全RNAを単離することが望ましい。また、低温耐性PFKを有することが知られている植物組織、具体的にはバレイショ低温低糖性品種Brodickの低温貯蔵塊茎を材料に用いるのが望ましい。

バレイショ塊茎より全RNAを単離する方法としては、例えばドテシル硫酸ナトリウム(SDS)／フェノール法などがある。調製した全RNAからPFKポリ(A)+RNAを得るには、ダイナビーズmRNA精製キット(DYNAL)などを用いることができる。この処理によって直接PFKポリ(A)+RNAを単離することは容易でないので、得られたポリ(A)+RNA集団を鋳型としてcDNAを作成し、これらを有する微生物集団(cDNAライブラリー)を作成することが望ましい。具体的には、GublerとHoffmanの方法(Gene, 25:263, 1983)等により2本鎖cDNAを合成し、アダプターDNAを介してDNAリガーゼにより適当なベクターに結合させ、宿主となる微生物を形質転換させ、cDNAライブラリーを作成する。ここで用いるベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合、pUC系あるいはλファージ系のものが利用しやすい。しかし、最も効率的に当該遺伝子をスクリーニングするには、バレイショ品種Brodick塊茎ポリ(A)+RNAより合成された2本鎖cDNAを制限酵素Eco RIとNot Iの認識部位を有するアダプターDNAを介してλgt10ファージベクターのEco RI部位にDNAリガーゼにより結合させた後、ファージ粒子を形成させ、cDNAライブラリーを作成すれば良い。次いで、このcDNAライブラリーからPFKポリ(A)+RNAに対応するcDNAクローンを同定する。

PFK cDNAクローンの同定は、精製した植物PFKの部分アミノ酸配列の決定に基づいて合成したオリゴヌクレオチド、あるいはこれらオリゴヌクレオチドをプライマーとし植物ゲノムDNAあるいはcDNAを鋳型としてポリメラーゼチャイン反応(PCR)によって増幅したPFK遺伝子の塩基配列の一部を有するDNAをプローブに用い、ブラークハイブリダイゼーション法によって行うことができる。

次に、バレイショ塊茎PFKコードDNAを有する形質転換体をプレートライ

セート法等により大量培養し、常法、例えばSambrook等の方法（Molecular Cloning:A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）によりファージDNAを精製し、さらに、制限酵素Not Iで消化後、アガロース電気泳動等を行うことにより、PFKをコードするcDNAを得ることができる。さらに、バレイショPFK遺伝子が一旦単離されたならば、この単離されたPFK遺伝子若しくはその一部をプローブとして用いることにより、又はその一部をPCR用のプライマーとして用いることにより種々の植物からPFK遺伝子を容易に単離することができる。

下記実施例に記載するように、種々の植物のPFK遺伝子のcDNAがクローニングされ、その塩基配列及び推定アミノ酸配列が決定された。種々の植物のPFK遺伝子のアミノ酸配列を比較することにより、植物PFKに共通な、5個以上のアミノ酸残基を有する13種のアミノ酸配列が同定された。従って、これらの配列若しくはその一部をコードする核酸又はこれらの配列をコードする領域を含む核酸であって、所望のPFK遺伝子とハイブリダイズするものをプローブ又はPCR用プライマーとして用いることにより種々の植物のPFK遺伝子を検出又は增幅することができる。表7に示すアミノ酸配列をコードするDNAは容易に化学合成できる。表7に示す配列のうち、配列(1)、(4)、(11)及び(12)（すなわち、配列表の配列番号11、14、21及び22）は植物のPFKに共通するが植物以外の生物のPFKには見られないものである。従って、これらの配列を用いることにより、他の生物由来のPFKが混入する可能性を排除して植物PFKを検出又は增幅することができる。プローブとしては、ヌクレオチド数15以上、遺伝子の全長以下の長さのものが好ましい。オリゴヌクレオチドを放射マーカー又は蛍光マーカー等で標識する方法はこの分野において周知である。また、PCR用のプライマーとしては、ヌクレオチド数15ないし30のものが好ましい。

このようにして得られるPFK cDNAの利用方法としては、まず第一に、これを微生物、植物および動物のベクター等に組み込んで微生物、植物および動物を形質転換し組織中のPFK活性を増大できることである。さらに別の利用法として、PFK cDNAを逆向きにベクターに挿入し、バレイショ等の植物組織中

で発現させ、本来植物が有するP F K活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、PEG-リソ酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルポンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞(BALB/c-3T3等)が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等)に記載の各種プラスミドベクター(pBR322、pUC系プラスミド等)およびファージベクター(λgt10、λgt11、λZAP等)などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等)に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター(pGA482、pBin19等)などのT i プラスミド由来のベクター類が挙げられる(文献:An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換えDNAを一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等(LBA4404等)のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該cDNAを導入することができる(文献:Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換えDNAを有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有する PFK 活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌 - R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、PEG-リシン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルポンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞 (BALB/c-3T3 等) が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種プラスミドベクター (pBR322、pUC 系プラスミド等) およびファージベクター (λ gt10、 λ gt11、 λ ZAP 等) などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター (pGA482、pBin19 等) などの T i プラスミド由来のベクター類が挙げられる (文献: An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換え DNA を一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等 (LBA4404 等) のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該 cDNA を導入することができる (文献: Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329 等)。なお、植物においてこれらの組換え DNA を有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させねばよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有するP F K活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルポンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞(BALB/c-3T3等)が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989等)に記載の各種プラスミドベクター(pBR322、pUC系プラスミド等)およびファージベクター(λgt10、λgt11、λZAP等)などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989等)に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター(pGA482、pBin19等)などのT i プラスミド由来のベクター類が挙げられる(文献:An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換えDNAを一旦アグロバクテリウム・ツムファシェンス等(LBA4404等)のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該cDNAを導入することができる(文献:Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換えDNAを有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有するP F K活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルポンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞(BALB/c-3T3等)が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989等)に記載の各種プラスミドベクター(pBR322、pUC系プラスミド等)およびファージベクター(λgt10、λgt11、λZAP等)などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989等)に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター(pGA482、pBin19等)などのT i プラスミド由来のベクター類が挙げられる(文献:An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換えDNAを一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等(LBA4404等)のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該cDNAを導入することができる(文献:Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換えDNAを有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有するP F K活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルポンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の单子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞(BALB/c-3T3等)が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等)に記載の各種プラスミドベクター(pBR322、pUC系プラスミド等)およびファージベクター(λgt10、λgt11、λZAP等)などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献(Molecular Cloning:A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等)に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター(pGA482、pBin19等)などのT i プラスミド由来のベクター類が挙げられる(文献:An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換えDNAを一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等(LBA4404等)のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該cDNAを導入することができる(文献:Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換えDNAを有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

の鋳型として、2本鎖cDNAは下記のcDNAライブラリーの作成に使用した。cDNAの合成方法は、試薬あるいはキットに添付されている方法に従った。

6 : λ gt10 cDNA ライブラリーの作成

品種Brodick 塊茎のポリ(A) + RNAからオリゴdT(12-18)をプライマーとして合成した、あるいは品種Recordの塊茎芽生えのポリ(A) + RNAからランダムヘキサヌクレオチドをプライマーとして合成した2本鎖cDNAを使い λ gt10 cDNA ライブラリーを作製した。 λ gt10cDNAクローニングキット(Amersham)を使い、添付されているマニュアルに従ってライブラリーを作成した。但しキットに含まれるアダプターは用いず、Eco R1/Not 1アダプター(Pharmacia LKB)を使用した。

7 : 精製したPFKのN末端部分をコードするcDNAの単離

表1に示すアミノ酸配列をもとにDNA合成機で合成したN10、N20RI(表2)各500pmolをプライマーとして、品種RecordのゲノムDNAあるいはBrodick 芽生えポリ(A) + RNA由来の一本鎖cDNA各々1.0、0.1 μ gを鋳型としてPCRを行った。緩衝液はTaqポリメラーゼ(Ampri Taq:Perkin-Elmer Cetus)に添付されているものをマニュアルに従って使用した。酵素は2.5U、各ヌクレオチドは20nmolずつ加え、総容量100 μ lで反応を行った。94°C 1分、50°C 2分、72°C 2分の一連の反応を35回繰り返したのち72°Cで10分反応させた。反応液の一部を取り、4%アガロースゲル電気泳動で解析したところ、いずれのDNAを鋳型にした場合も約60塩基対のPCR産物が検出された。これら約60塩基対のDNAをプラスミドベクター pCR1000(Invitrogen)に添付されているマニュアルに従ってサブクローニングした。その結果、数多くの組換えプラスミドを有する大腸菌コロニーを得た。このうち、約60塩基対の挿入断片を持つ7クローン(Record cDNA由来4クローン、Brodick ゲノムDNA由来3クローン)から常法に従ってプラスミドを回収した。これら7クローンが有するPCR産物の塩基配列をジデオキシチェインターミネーション法で決定した。SEQUENASE Var2(U.S. Biochemical Corp.)を使い、添付されているマニュアルに従って塩基配列を決定した。1クロ

ーンを除き他の6クローン(Record cDNA由来4クローン、BrodickゲノムDNA由来2クローン)は共通のDNA塩基配列(23塩基対)を有していた。この23塩基をDNA合成機で合成したものをPFK23(表3)と名付け、下記のPCRのプライマーとして、あるいはcDNAライブラリーのスクリーニングの際にプローブとして使用した。

表3 PFK23のDNA塩基配列(5' → 3')

ATGAAGGTGGTGAAAGGAGATTA

8:部分長PKcDNAの単離

品種Record芽生え λ gt10cDNAライブラリー(15万pfu)をプレートライセート法で増幅したのち精製した λ DNA 1.0 μ gを鋳型として、PFK23と λ gt10のDNA塩基配列を持つ λ 1232(表4)各100pmolをプライマーとしてPCRを行った。アニーリング温度が60°Cである点を除き、反応条件は前出のPCRと同様である。その結果、約600塩基対のPCR産物が得られた。このPCR産物を前出のプラスミドベクターpCR1000にサブクローニングし、得られた組換えプラスミドの1つをpPFK01と命名した。プラスミドpPFK01に挿入されているPCR産物のDNA塩基配列を前出の方法に従って決定した。DNA塩基配列からアミノ酸配列を推定したところ、一部は既知のPKのアミノ酸配列と有意な相同性を示した。また5'末端には上記の精製PKから決定されたアミノ酸配列をコードするDNA塩基配列が存在した。

9:完全長PKcDNAの単離

プラスミドpPFK01を制限酵素Not1で切断して得られる約600塩基対のDNA断片を放射性同位元素 32 Pで標識し、これをプローブとして品種Brodick塊茎 λ gt10cDNAライブラリー(約40万pfu)をプラークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。その結果、57個の独立の陽性プラークを得た。このうち24プラークを無作為に選び、上記約600塩基対のDNA断片とPFK23をプローブとして2次スクリーニングを行った。その結果、11クローンが両標識プローブに対し陽性であった。更に三次スクリーニングの後、これ

ら独立の 11 クローンからプレートライセートを調製した。ライセート 10 μ l を鋳型として、また表 4 に示した合成DNA λ 1232 および λ 1231 各 50 pmol をプライマーとして PCRを行った。アニーリング温度が 60 °Cである点を除き、前出のPCRと同様に反応を行った。PCR 産物を 0.8%アガロースゲル電気泳動で解析した結果、 λ DNA の部分を除いた cDNA 断片のみの長さは約 1700 - 2200 塩基対と推定された。前出の約 600 塩基対のDNA断片を放射性同位元素³²P で標識したプローブを使い、バレイショ塊茎ポリ(A) + RNAを常法に従ってノーザン解析したところ、PCRの結果とほぼ一致する約 2000 - 2300 塩基のポリ(A) + RNAが検出された。これらの 11 個の λ gt10 クローンから制限酵素Not 1 で切出された挿入DNA断片部分をプラスミドベクター pBruescript SK II(-) (Stratagene) の制限酵素Not 1 認識部位にサブクローニングした組換えプラスミドを pPFK16、17、19、26、28、29、31、32、33、34、35 と命名した。

表4 PCRに用いた λ gt10由来のプライマーのDNA塩基配列(5'→3')

λ 1 2 3 2 :	CTTATGAGTATTCTTCCAGGGTA
---------------------	-------------------------

λ 1 2 3 1 :	AGCAAGTTCAAGCCTCGTTAAG
---------------------	------------------------

pPFK32 の cDNA 挿入断片については全DNA塩基配列 1978 塩基対を前出の方法に従って決定し、アミノ酸配列と共に配列表の配列番号 1 に示した。決定した精製 PFK の N 末端アミノ酸配列（配列表の配列番号 1 中の第 3 番目のスレオニンから第 26 番目のロイシンまで（もっとも、精製 PFK の第 24、25 番目のアミノ酸は表 1 に示すように決定できなかった））を含む 485 アミノ酸に翻訳される 1455 塩基対からなる領域を有していた。推定アミノ酸配列から、精製バレイショ塊茎 PFK ポリペプチドの N 末端よりも 2 アミノ酸上流に開始コドンにコードされるメチオニンがあった。推定分子量は 53.8 キロダルトンで、Kruger 等 (Arch. Biochem. Biophys. 267, 690-700. 1988) が推定したバレイショ塊茎 PFK-d ポリペプチドの分子量 53 キロダルトンとほぼ一致した。133 - 135 番目の ATG が PFK の開始コドンである理由は、まず、この ATG の

前にフレームの異なる終止コドン（例えばTGA：15-17番目、TAA：26-28番目、TGA：55-57番目）が存在し、単離したcDNAの1番目の塩基C以前にATGがたとえ存在してもそれはPFKの開始コドンとはならないからである。また、36-38番目にATGが存在するが、90-92番目に終止コドン（TGA）が同じフレームで存在し、このATGはPFKの開始コドンにはならない。

《単離したcDNAにコードされるPFKの特性》

10：植物PFK遺伝子の大腸菌での発現

単離した遺伝子がまちがいなく酵素活性を持つPFKをコードする遺伝子であることを証明するためには、その遺伝子を実際に発現させる必要がある。そこで、単離した遺伝子を下記のように大腸菌に導入してその発現を試みた。

まず、プラスミドpPFK32 250ngを鋳型として、制限酵素Eco R1、Pst 1認識部位をそれぞれ導入したPFK32とPFK32R（表5）各30pgをプライマーとしてPCRを行った。アニーリング温度が30、35あるいは40°Cであること、反応回数が5回であること、DNAポリメラーゼとしてpfu DNAポリメラーゼ（Stratagene）を使用したことを除き、前出の方法と同様に反応を行った。PCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動で分画後、目的の約1800塩基対のバンドを切り出し、常法に従ってDNAをゲルの中から回収した。この約1800塩基対のDNAを制限酵素Eco R1、Pst 1で切断後、制限酵素Eco R1、Pst 1で切断した大腸菌発現プラスミドベクターpKK223-2（Pharmacia LKB）に組込んだ。この組換えプラスミド（pKK32）を常法に従って大腸菌XL1-Blue（Biotechniques. 5, 4. 376-378, 1987）に導入後、抗生物質カーベニシリン（50μg/ml）を含むLuria-Bertani（以下LBと称する）寒天培地上、37°Cで一晩培養した。出現した多数のコロニーの中から110個を選び、プラスミドpPFK32から制限酵素Not 1で切り出される約2000塩基対のDNA断片を放射性同位元素³²Pで標識し、これをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、66個の陽性コロニーを得た。これらバレイショPFK遺伝子の導入が確認された大腸菌は、微生物PFKとは活性制御の受け方の異なるPFKが発現して代謝を乱すためか、イソ

プロピルβ-D-チオガラクトピラノシド（以下 IPTG と称する）1 mMを含むLB寒天培地上ではほとんど生育できなかった。そこで、以下のように大腸菌に導入した PFK 遺伝子を発現させた。まず、カーベニシリン（50 μg/ml）を含むLB液体培地中で600nm 吸光値が0.3-0.7 になるまで37°Cで振盪培養した。次に IPTG (1 mM) を加え、一定時間振盪培養後菌体を回収し、Tabita等の方法 (Anal. Biochem. 84, 462-472, 1978) に従いトルエンで溶菌後、PFK活性をKruger等の方法 (Arch. Biochem. Biophys. 267, 690-700, 1988) に従い測定した。大腸菌No. 58株は、コントロールの大腸菌No. 1株 (pKK223-2を導入) に比べ約7倍高い PFK活性を示した（図1）。

表5 制限酵素Eco R1、Pst 1 認識部位を導入したPCRプライマーのDNA塩基配列（5' → 3'）

PFK 3 2 : TATATATTGGAATTCATGGGTACTGAG

Eco R1

* *

PFK 3 2 R : CAAAAGACCCTGCAGCCACACAG

Pst 1

*:ミスマッチ部位

次に、大腸菌No. 58株の持つ高 PFK活性が植物 PFK に由来するのか、それとも大腸菌XL1-Blue の PFK活性に由来するのかを調べるため、免疫滴定実験をKruger等の方法 (Arch. Biochem. Biophys. 267, 690-700, 1988) に従って行った。

免疫滴定実験の結果、大腸菌No. 58株の持つ高 PFK活性は抗大腸菌 PFK抗体ではほとんど除去されなかったが、抗バレイショ PFK-c 抗体（オックスフォード大学植物科学部Kruger博士から譲渡）では有意に除去された（図2）。この抗バレイショ PFK-c 抗体は、バレイショ PFK-c および PFK-d と強く反応し、大腸菌 PFK とはほとんど反応しないことがウェスタンプロ

ット解析、あるいは免疫滴定実験により確認されている。

以上の結果から、大腸菌No. 58株でIPTG誘導発現した蛋白質は間違いなくバレイショPFKであると同定され、プラスミドpPFK32に挿入されているcDNAはバレイショPFK遺伝子と同定された。

11：バレイショPFKと他生物PFKのアミノ酸配列の比較

pPFK32の有するバレイショPFKをコードするcDNAの塩基配列から推定したアミノ酸配列をデータベース(The Swiss Prot data bank (Release 23))検索により既知のPFKアミノ酸配列と比較した。報告のあるPFKと数十%以下の相同性しか示さなかったが、相同部位はPFKを特徴付ける基質、補酵素、制御物質の結合部位(Evans, P.R and Hudson, P.J. (1979) *Nature.*, 279, 500-504)とその周辺部に集中していた。有意な相同性を示した領域はアミノ酸番号でおよそ98-321であり、アミノ酸番号1-97、322-485のN末端、C末端領域では、報告のある他生物PFKと有意な相同性はほとんど見い出せなかった。報告のある真核生物PFKはF6Pが結合する触媒部位と、それとアミノ酸配列が良く似ているフルクロース-2,6-二リン酸が結合する制御部位の2つが1本のポリペプチド鎖上にあるデュプリケート構造を有している。今回単離した植物PFK遺伝子の塩基配列から決定されたアミノ酸配列はそのような構造を持たないことが明らかになった。また、他生物PFKに共通して保存されているアミノ酸であるにもかかわらずバレイショPFKでは保存されていないアミノ酸がF6Pの推定結合部位のいくつかを含めて数十個も存在した。以上のこととは、植物PFKが今まで報告のあるPFKとは異なる構造、機能を持つことを示唆している。

また、植物には、プラスチド型と細胞質型の2種類のPFKがあると言われている。本発明のバレイショPFK cDNAにコードされるPFKは、精製タンパク質に比べ2アミノ酸(Met、Gly)長いN末端を有しているが、この相違が精製によって生じた切断によるものか細胞内で生じた切断によるものか不明である。しかし、アミロプラストや葉緑体といったプラスチドへのポリペプチドの輸送に関与するトランジットペプチドを持たず、細胞質型PFKをコードしていることが明らかになった。

12：大腸菌で発現したバレイショ由来P F Kの精製

バレイショ P F K の発現が確認された大腸菌 N o. 58 株からバレイショ P F K を以下のように精製し、低温下での安定性について調査した。約 0.3 g の菌体を抽出用緩衝液 (100mM Tris-HCl(pH8.0), 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 14mM 2-メルカプトエタノール、1mM PMSF, 1μM ロイペプチド、1μM ペプスタチン) に懸濁後、超音波破碎し、50,000 x g で 30 分間遠心後、上清を回収した。次に、抽出用緩衝液にグリセロールを 10% (v/v) 添加した緩衝液 A で平衡化したシバクロンブルーアガロース (type 3000-C L、Sigma) カラム (16 X 55 mm) に上清を掛けた。この操作により大部分の大腸菌 P F K はゲルに強く吸着し、バレイショ P F K の大部分は、吸着せずフロースルーとして回収された。次に、回収液を緩衝液 A で平衡化したリアクティブレッド 120-アガロース (type 3000-C L、Sigma) カラム (16 X 110 mm) に掛け P F K を吸着させた。25 ml の緩衝液 A で洗浄後、0-1.0 MKC1 直線濃度勾配をつけた緩衝液 A 150 ml を使い P F K を溶出した。P F K 活性を含む画分を集め、限外濾過 (Amicon PM 10 膜) により 3 ml に濃縮後、緩衝液 A で平衡化したバイオゲル P-6 カラム (Bio-Rad) で脱塩した。最後に、脱塩した試料を緩衝液 A で平衡化したモノ Q カラム (0.5 X 50 mm, Pharmacia LKB) に掛けた。5 ml の緩衝液 A で洗浄後、0-1.5 MKC1 直線濃度勾配をつけた緩衝液 A 150 ml を使い P F K を溶出した。P F K 活性を含む画分を集め精製標品とした。精製標品を尿素/SDS-PAGE で分画後、ゲルを CBB 染色、あるいはニトロセルロースフィルターにポリペプチドを転写し、抗バレイショ P F K-c 抗体を使ったウェスタンプロット解析を行った結果、両者とも 53 キログルトンのポリペプチドを検出した (図 3)。この結果、単離した P F K 遺伝子は P F K-d をコードすることが判明した。

13：大腸菌で発現したバレイショ P F K の低温耐性の確認

この精製した P F K を使用し酵素活性の低温安定性を 0 ~ 25 °C の温度範囲で Hammond 等の方法 (Planta 180, 613-616, 1988) に従って調査した。低温下での酵素の安定性を示す指標として Q10 値を使用した。X 軸に温度、Y 軸に酵素活性の対数を取ったグラフのある温度での傾きを dy/dx とすると、dy/dx

= 0. 1 log Q10 で表される。大腸菌で発現させたバレイショ品種Brodick 由来のPFKは0°Cの低温下でQ10値が2.42という低い値を示し、25°Cの室温下のQ10値1.66に比べてもさほど変化しなかった(表6)。プラスミドpPFK32に挿入されているcDNAがコードするPFKの5°CでのQ10値は2.24であったが、この値を他の報告されているPFKのQ10値と比較してみると、大腸菌PFK-1では5°CでのQ10値が2.89(Kruger, N.J.(1989)Biochemical Society Transaction 629th Meeting, London Vol. 17 760-761)、低温低糖性を有さないバレイショ品種Recordの塊茎PFKでは、2-6°CでのQ10値が3.10(PFKIII)および4.20(PFKIV)(Hammond, J.B.W. et al. Planta (1990)180, 613-616)であり、本発明で単離したバレイショPFK遺伝子にコードされるPFKが、大腸菌PFKや低温低糖性を有さないバレイショ品種のPFKに比べ有意に低温耐性を有していることが証明された。またPFKと基質F6Pを巡って競合関係にあるスクロース合成系の律速酵素SPSのQ10値は、2-10°Cで2.25とap Rees等が報告しているが(Plants and Temperature (ed. Long, S.P. and Woodward, F.I.) Society of Experimental Biology Seminor Series No. 42. Cambridge, UK; Cambridge University Press. pp.377-393)、本発明のPFKはSPSと同レベルの低温耐性を有している(表6)。よって本発明のPFK遺伝子を、低温貯蔵中の塊茎で強く発現するプロモーターの支配下で発現させることにより、低温貯蔵塊茎中のスクロース含量の低いバレイショ品種を開発することができ、その結果、低温低糖性(グルコース、フルクトース含量の低い)バレイショ品種を作出できる。

表6 大腸菌で発現させたバレイショPFKのQ10値

温度 (°C)	0	1	2	5	7	10	15	20	25
Q10値	2.42	2.38	2.35	2.24	2.18	2.10	1.93	1.79	1.66

14 : 種々植物PFK遺伝子の単離

単離したバレイショ PFK cDNAをプローブとして、種々植物 PFK 遺伝子の単離を試みた。イネ（品種月の光）未熟胚由来カルス、トウモロコシ胚乳由来カルス、フラベリア緑葉、ラディッシュ緑葉から前述のバレイショと同様の方法で mRNA を単離し、以下の方法で cDNA ライブラリーを作成した。イネ、フラベリア、ラディッシュ cDNA ライブラリーは、TimeSaver cDNA Synthesis Kit(Pharmacia)、λ ZAP II Cloning kit(Stratagene)、Gigapack II Gold (Stratagene) を使用し、添付されているマニュアルに従って作成した。トウモロコシ cDNA ライブラリーは、cDNA Synthesis Kit(Amersham)、λ gt10 cDNA cloning kit(Amersham) を用いて、キットに添付されているマニュアルに従って作成した。

作成した cDNA ライブラリーから、 PFK cDNA が組み込まれたラムダファージをラークハイブリダイゼーション法によって単離した。その際、前出のプラスミド pPFK32 から制限酵素 Not I を用いて切り出される約 2 キロ塩基対の DNA 断片を放射性同位元素 ³²P で標識しプローブとして使用した。その結果、作成した全ての cDNA ライブラリーから本プローブと反応する陽性ラークを得ることができた。トウモロコシ PFK cDNA は、プレートライセート法を使って精製した λ DNA を制限酵素 EcoR I で消化し、 PFK cDNA を含むインサート部分をプラスミド pBluescript SK II (-)(Stratagene) にサブクローニング後、前出のバレイショ PFK と同様の方法で DNA 塩基配列を決定した。その他の植物 PFK cDNA は、λ ZAP II Cloning kit(Stratagene) に含まれるヘルペラーファージ (ExAssist helper phage(M13)) と大腸菌 (SOLR strain) を使い、添付されているマニュアルに従ってプラスミド pBluescript SK(-)(Stratagene) にサブクローニング後、前出のバレイショ PFK と同様の方法で DNA 塩基配列を決定した。フラベリア、イネ、トウモロコシ、ラディッシュ PFK の DNA 塩基配列を各々配列表の配列番号 3、5、7、9 に示し、DNA 塩基配列から推定されるアミノ酸配列を各々配列表の配列番号 4、6、8、10 に示した。いずれの植物 PFK アミノ酸配列もバレイショ PFK - d アミノ酸配列（配列表の配列番号 2）と非常に高い相同意を示したが、報告されている細菌、ほ乳類、酵母等の他生物 PFK 塩基配列との相同意はそれに比べ有意に低かった。今回バレイシ

ヨ PFK遺伝子をプローブに使用して PFKが単離された植物は、单子葉植物（イネ、トウモロコシ）、双子葉植物（フラベリア、ラディッシュ）の両者を含み、植物種では、イネ科（イネ、トウモロコシ）、キク科（フラベリア）、十字花科（ラディッシュ）と広範囲に渡り、配列表の配列番号1に示したバレイショ PFK cDNAは種々植物 PFK遺伝子の単離に広く利用できることが証明された。

また種々植物 PFKのアミノ酸配列を比較した結果、種々植物に共通して存在するアミノ酸配列（5アミノ酸以上）が13箇所見つかった（表7）。この中には、報告のある他生物 PFKには存在しない植物特異的なアミノ酸配列が含まれている（配列表の配列番号11、14、21、22）。特に、配列表の配列番号22に示したアミノ酸配列は、この配列が PFKポリペプチド上に存在する位置から判断して、細菌 PFKで報告されている基質F6Pの結合部位およびその近傍のアミノ酸配列（Leu Gly His Val Gln Arg Gly Gly 付近）に相当すると考えられる（Evans, P.R. and Hudson, P.J. (1979) Nature., 279, 500-504）。この基質結合部位およびその近傍のアミノ酸配列は、他生物間では非常に良く保存されているが（Heinisch, J. et al., (1989) Gene., 78, 309-321）、植物ではこのアミノ酸配列は全く存在せず、そのかわり配列番号22に示した別のアミノ酸配列が共通配列として存在することが明らかになった。

以上のように、配列表の配列番号1に示したバレイショ PFK cDNAは、種々植物 PFK遺伝子の単離にプローブとして利用可能であることが証明された。また、種々植物 PFKアミノ酸配列の比較から、植物 PFKに共通して存在すると考えられるアミノ酸配列（表7）が同定され、例えば、PCR法を利用して植物から PFK遺伝子を単離する際にDNAプライマー合成の参考になるアミノ酸配列が本発明によって供給された。さらに、他生物 PFKには存在することが報告されていないが植物 PFKには共通して存在すると考えられるアミノ酸配列が同定された。つまり、本発明によって植物 PFKを特徴づけるアミノ酸配列（配列表の配列番号11、14、21、22）が初めて同定された。

表7 種々植物P F Kに共通のアミノ酸配列
(番号は配列番号1中のアミノ酸番号に対応)

(1) Arg Ala Gly Pro Arg	
	80
(2) Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn	
	100 105
(3) Gly Tyr Arg Gly Phe	
	135
(4) Ile Val Asp Ser Ile Gln	
	175
(5) Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile	
	220
(6) Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu	
	230 235
(7) Ala Gln Arg Ala Ile Asn	
	240
(8) Val Lys Leu Met Gly Arg	
	260 265
(9) Ser Gly Phe Ile Ala	
	270
(10) Ala Glu Gly Ala Gly Gln	
	320
(11) Asp Ala Ser Gly Asn	
	340
(12) Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met	
	370 375
(13) Cys Leu Ile Pro Glu	
	285

15：植物形質転換用プラスミドベクターの構築

バレイショ品種Brodick の低温耐性遺伝子を植物に導入するために、図4に示したプラスミドpPFK(35S)を作成した。以下にプラスミドpPFK(35S)の詳しい作成方法を述べる。まず、制限酵素HindIII、Not I、Bgl II、BamH I、EcoR I、Sma I、Pst I、Sst I、Bcl I、Bgl II、Not I、EcoR Iの認識配列をこの順番に含むポリリンカー (Agricultural Genetics Company, Cambridge, United Kingdomより入手) を制限酵素HindIII、EcoR Iで消化したプラスミドpUC19 に連結し、これをpUC19(PL)と命名した。次に、プラスミドpAPT9 (Agricultural Genetics Company, Cambridge, United Kingdomより入手) から制限酵素Sst I、BamH Iによって切り出されるノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニレーションシグナル配列 (約0.3キロ塩基対) を制限酵素Sst I、Bcl Iで消化したpUC19(PL) に連結し、これをpUC19(nos term)と命名した。次に、パタチン (patatin) プロモーター配列部分をプラスミドpBI240.7 (Bevan et al., Nucleic Acid research 14:4625-4638, 1986) から制限酵素Bgl II、BamH Iを使って約2.3キロ塩基対の断片として切り出し、制限酵素Bgl II、BamH Iで消化したpUC19(nos term) に連結し、これをpUC19(pat/nos term)と命名した。次に、前述のプラスミドpKK32 から制限酵素EcoR I、Pst Iを使って低温耐性PFK遺伝子 (約1.8キロ塩基対) を切り出し、制限酵素EcoR I、Pst Iで消化したpUC19(pat/nos term) に連結し、それをpPFK(pat)と命名した。次に、プラスミドpPFK(pat)を制限酵素EcoR Iで消化後、大腸菌DNAポリラーゼIのクレノウ断片 (Klenow fragment) で平滑末端化した。最後に、この平滑末端化したプラスミドを制限酵素Sst Iで消化し、切り出された約1.8キロ塩基対の低温耐性PFK遺伝子を、制限酵素Sma I、Sst Iで消化したプラスミドpROK2(pBin19由来: Baulcombe, D. et al., (1986) Nature., 321, 446-449)に連結し、これをpPFK(35S)と命名した (図4)。

16：バレイショの形質転換

シェンとフォードが報告したエレクトロポレーション法 (Shen, W-J and Forde, B.G (1989) Nucleic Acid Research 17, 8385) を利用して、

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 に図 4 に示したベクタープラスミド pPFK (35S) を導入し、その菌株を LBA4404(35S/PFKd) と命名した。次に LBA4404(35S/PFKd) を用いて植物の 1 例としてバレイショ品種 Bintje の形質転換を試みた。以下に形質転換法について詳しく述べる。まず、バレイショ品種 Bintje のウィルスフリー無菌植物体はスコティッシュアグリカルチュラルサービスエージェンシー (Scottish Agricultural Services Agency, Edinburgh, United Kingdom) より購入した。購入したインビトロ植物体から複数の単節を無菌的に切り出し、各節をリンスマイアートスクレーブの培地（以下 LS 培地と称する） (Linsmaier, E. and Skoog, F. (1965) Physiol. Plant., 18, 100-127) の無機塩、スクロース 30 g/L、寒天 8 g/L を含む固体培地に置床し培養することによって無菌植物体を増殖した。この増殖した植物体の茎あるいは葉を以下の形質転換に利用した。無菌的に切り出した茎（長さが約 0.5 - 2.0 cm）あるいは葉（縦が約 0.6 - 1.0 cm、横が約 0.5 - 1.0 cm の大きさ）は、LS 培地の無機塩、30 g/L のグルコースを含む液体培地で LBA4404(35S/PFKd) と 25 °C で 48 時間共存培養した。共存培養開始時の LBA4404(35S/PFKd) の濃度は約 108 細胞/mL に調整した。共存培養終了後、茎あるいは葉の切片を抗生物質セフォタキシム (cefotaxim) を 250 mg/L 含む滅菌水で数回洗浄した。洗浄後、笠岡らが報告した KS 1 培地（特開平 6-133783）に茎あるいは葉の切片を置床した。置床後約 20 日で抗生物質カナマイシン (kanamycin) 抵抗性カルスが出現し、更に 10 - 30 日培養を続けるとカルスから植物体が再分化した。このカナマイシン抵抗性を示す植物体を単節毎に切断し、各々を LS 培地の無機塩、スクロース 30 g/L、セフォタキシム 250 mg/L、カナマイシン 100 mg/L、寒天 8 g/L を含む固体培地に置床し培養することによってカナマイシン抵抗性植物体を増殖した。増殖した植物体は、ポットに移植後、温室で栽培した。コントロールには、非形質転換体の品種 Bintje を用いた。コントロール植物体は、形質転換体と同様に試験管内で無菌的に増殖後、温室でポット栽培した。形質転換植物体およびコントロールの非形質転換植物体は、ポットに移植してから約 4 ヶ月後、植物体が完全に自然枯死した時点で塊茎を収穫した。収穫した塊茎は、低温貯蔵庫（庫内温度 5.5 - 8.5 °C あるいは 15 °C）に貯蔵

した。この塊茎を以下の種々の解析に供試した。

17：形質転換体バレイショにおける低温耐性PFKの発現

非形質転換体系統B40とカナマイシン抵抗性を有する形質転換体系統B75の茎葉からCTAB法 (Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) Phytochemical Bulletin., 19, 11-15) によりDNAを抽出し、Sambrook等の方法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従ってサザン解析を行った。具体的には、DNAを制限酵素EcoRIで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、DNAをナイロン膜に転写後、放射性同位元素³²Pで標識したDNAプローブと反応させた。プローブとして、nos terminator領域 (280塩基対) あるいは前出のプラスミドpKK32を制限酵素Bgl IとPst Iで消化することによって切り出される低温耐性PFK DNAの3' 非翻訳領域 (235塩基対) を用いた。いずれのDNA断片をプローブとして用いた場合も系統B75ではテトラブロイド当たり5コピーの遺伝子が導入されていることが確認された (データは示していない)。

次に温室でポット栽培した系統40あるいは系統B75から収穫した塊茎 (15°Cで2ヶ月貯蔵) からRNAを精製し、Sambrook等の方法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従ってノーザン解析を行った。試料として全RNA 30 μgを用いた。プローブとして、前出のプラスミドpKK32を制限酵素Bgl IとPst Iで消化することによって切り出される低温耐性PFK DNAの3' 非翻訳領域 (235塩基対) を放射性同位元素³²Pで標識したDNAを用いた。その結果を図5に示した。系統B75の塊茎では非常に強いシグナルが検出されたが、非形質転換体系統B40では、全くPFKポリ(A) + RNAは検出されなかった。本発明者の経験から、バレイショ塊茎中のPFKポリ(A) + RNAをノーザン解析によって検出する場合、全RNAではなく、さらに精製されたポリ(A) + RNAを試料として使用しなければ検出が困難なことが判明している。このことから判断して、系統B75の塊茎中では通常のバレイショでは考えられないほど大量のPFKポリ(A) + RNAが発現しており、この過剰の

PFKポリ(A) + RNAは導入された低温耐性PFK遺伝子の転写産物と考えられた。

次に、収穫後15°Cで2ヶ月貯蔵した系統B75とB40の塊茎からKruger等の方法(Kruger, N.J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700)に従って粗抽出液を調製し、ウェスタン解析を行った。抗体は、前出の抗バレイショPK-c抗体を用いた。その結果を図6に示したが、使用した抗体と非特異的あるいは特異的に反応し検出されたポリペプチドの中で、系統B75と系統B40で違いが見られたのはこのPK-dのみであった。系統B75の塊茎ではコントロール系統B40の塊茎に比べ約3-4倍多いPK-dポリペプチドが発現していることが判明した。この結果は、前出のノーザン解析の結果を裏付けるものであるが、系統B75では、PKポリ(A) + mRNAの発現量に比べPK-dポリペプチドの発現量は低かった。これは外来PK遺伝子のPK(A) + mRNAへの転写量とそのタンパク質への翻訳量の比が、バレイショ塊茎が本来有するPK遺伝子のPK(A) + mRNAへの転写量とそのタンパク質への翻訳量の比に必ずしも一致しないことに起因するものと考えられる。

次に系統B75とB40の塊茎(収穫後15°Cで2ヶ月貯蔵)からKruger等の方法(Kruger, N.J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700)に従って粗抽出液を調製し、PK活性を測定した。1回の測定に塊茎1個を使用し、3回の測定値の平均値を表8に示した。その結果、系統B75は系統B40の約1.3倍高い全PK活性を有していることが確認された。全PK活性とは、Kruger等(Kruger, N.J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700)が報告したPK-a、-b、-c、-dの4種のポリペプチドの種々の組合せによって構成されるPK I、II、III、IVの活性の合計である。前出の大腸菌での発現実験で、PK-dポリペプチドのみで活性のある酵素を構築できることが証明されたが、系統B75の塊茎で観察されたPK活性上昇は、導入されたPK-d遺伝子の過剰発現によってのみもたらされたと考えると、全PK活性が約1.3倍の増加したという結果は、前出のウェスタン解析の結果(PK-dが3-4倍に増加)と矛盾しない。

次に系統B75の塊茎(収穫後15°Cで2ヶ月貯蔵)から粗抽出液を調製後、

レッドアガロース、モノQカラムを用いてPFK-dを含むPFKIVを部分精製し、種々の低温下でPFK活性を測定した。以下に具体的方法を説明する。まず、約20gの塊茎を約2-5mmの厚さにスライスし液体窒素中で凍結させ、マイナス70℃の低温下で保存した試料を酵素精製に用いた。以下全ての精製操作は4℃で行った。凍結試料は、40mLの抽出緩衝液（前出の緩衝液Aに2mM benzamidine, 1mM PMSF, 1μM leupeptin, 1μM pepstatin, 1% (W/V) insoluble polyvinylpyrrolidonを添加したもの）を加え、乳棒と乳鉢で充分摩碎した。摩碎液をミラクロスで濾過後、濾液を20,000gで30分間遠心し、上清を回収した。上清をフィルター(0.45μm)で濾過後、緩衝液Aで平衡化したリアクティブレッド120アガロース(Type 3000-CL, Sigma)カラム(16X110mm)に掛けてPFKを吸着させた。以後の精製操作は、前出の大腸菌で発現させたPFKの精製操作に従った。モノQカラムクロマトグラフィーによってPFKは4つのピークに分離し、その中のPFKIVに相当する画分を回収し種々の温度でPFK活性を測定しQ10値を求めた。その結果を表9に示したが、部分精製されたPFKIVは低温下においても全く安定であり、そのQ10値は0℃から25℃のいずれの温度においても1.9-2.0であった。表6に大腸菌No.58株から精製したPFKのQ10値を示したが、その結果と表9の結果を比較すると、両者には同一遺伝子が導入されているが、系統B75のPFKIVは大腸菌No.58株で発現したPFKに比べ低温に対しより安定であった。また、系統B75に導入されたPFK遺伝子は元々バレイショ品種Brodickから単離された遺伝子であるが、Hammond等(Hammond, J.B.W. et al., (1990) Planta., 180, 613-616)が報告したバレイショ品種BrodickのPFKIVよりも低温に対し安定であった。ウエスタン解析の結果から判断して系統B75で発現しているPFK-dポリペプチドの2/3から3/4は導入遺伝子の発現に由来すること、またKruger等(Kruger, N.J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700)が報告しているようにPFKIVがPFK-dポリペプチドを主要に含むことから判断して、B75のPFKIVで確認された低温耐性は導入遺伝子の効果である。

以上のように、図4に示したベクタープラスミドを用いて、大腸菌で低温耐性

PFKとして発現することが確認された遺伝子のバレイショへの導入を試みた結果、系統B75で導入遺伝子の発現が確認され、且つ系統B75のPFKIVが低温耐性を有することが確認された。

表8 系統B75の塊茎中の全PFK活性

系統	PFK 活性(nmol/min/g FW)
B40(コントロール)	108.4
B75	141.4

表9 系統B75の塊茎から部分精製したPFKIVのQ10値

温度 (°C)	2	5	7	10	15	20	25
Q10値	1.91	1.92	1.92	1.93	1.94	1.95	1.96

18：低温耐性PFK遺伝子を導入したバレイショ塊茎の低温貯蔵下での糖含量の変化およびそれを材料として調製したポテトチップの色の変化

低温貯蔵(5. 5 - 8. 5°C)した系統B75とB40の塊茎の糖含量とポテトチップ色を調査した。その結果を表10に示した。糖としてグルコース含量を市販の尿糖試験紙(商品名: テステープ、塩野義製薬株式会社製)を用いて測定した。具体的には、塊茎1個当たり1箇所塊茎表面にスパチュラを強く押し当てて深さ約5mmの溝を切り込み、そこに尿糖試験紙を差し込み、グルコース含量を測定した。グルコース含量は、変化した試験紙の色を試験紙の容器に添付されているカラースケールと対比させ、以下に説明したスコアで表示した。容器のスコア0、+、++、+++、++++は、それぞれグルコース含量約0%、0.1%、0.25%、0.5%、2%以上に相当する。表10に示した値は、カラースケールのスコア0、+、++、+++、+++を便宜上それぞれ0、1.

0、2、0、3、0、4、0とした場合の値として表示している。表10に示した値は、5個の塊茎の測定値の平均値である。この値は、低いほどグルコース含量が低いことを意味している。その結果、系統B75では低温貯蔵4週間後の塊茎において、系統B40に比べグルコース含量が低いことが判明した。

一般に塊茎のグルコース含量とポテトチップ色の間には非常に高い相関関係があることが知られている (Gray, D and Hughes, J. C. (1978) *The Potato Crop* (ed. P. M. Harris), Capmann & Hall, London, pp. 504-544)。そこで、実際に系統B75、B40の低温貯蔵(2週間、4週間、12週間)塊茎を材料にしてポテトチップを調製し、褐変度を比較した。具体的には、塊茎を市販のスライサーで薄切りにし、これを180°Cに熱した市販の食用油(なたね油と大豆油の混合油)の中で通常約3分から4分、気泡が出なくなるまで揚げてポテトチップを調製した。ポテトチップは、1系統1試験当たり5個の塊茎から3枚ずつ、合計15枚調製し、それぞれを肉眼によってポテトチップ用カラーカード(The Institute for Storage and Processing of Agricultural Produce, Wageningen, The Netherlands 作成)と対比させ、カラーカードに書かれているスコアで褐変度を表示した。このスコアは、値が高いほどポテトチップの褐変度が低いことを意味している。結果を表10に示したが、各スコアはポテトチップ15枚の平均値である。系統B75では、低温貯蔵2週間、4週間、12週間後のいずれの塊茎を供試しても系統40に比べ褐変度の低いポテトチップが調製された。

以上のように、図4に示したベクタープラスマドを用いてバレイショを形質転換し、低温耐性PKFを塊茎中で発現させることにより、低温貯蔵塊茎中のグルコースを減少させ、その結果ポテトチップの褐変を軽減できることが証明された。

表10

低温耐性P F Kを発現させた系統B 75のグルコース含量とポテトチップ色

	グルコース 含量(カラースコア)		ポテトチップ 色(カラーカードスコア)			
	0	4 (週間貯蔵後)	0	2	4	12 (週間貯蔵後)
B40(control)	1.0	2.6	7.0	4.0	2.6	2.3
B75	1.0	1.2	7.0	5.5	3.7	3.5

配列表

配列番号：1

配列の長さ：1978

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ソラナムチュベローサム(Solanum tuberosum L.)

品種名：ブロディック(Brodick)

組織の種類：塊茎

直接の起源

ライブラリー名：低温貯蔵塊茎mRNA由来 λgt10 cDNA ライブラリー

クローン名：pPKF32

配列

CTCTTTCTT GGGTTGACTC AAATTTAAC A TATATATGTA TTTTTTTGTT TTTGTGATT C 60

TGTTTTCAGA TACCCCTTTG AATTTCCATT GAGAAAGTTG GAATCTTTT TGTTTTATA 120

TATTTGGGGA AG ATG GGT ACT GAG AGT AAT TAC CAG ATG AAG GTG GTG AAA 171

Met Gly Thr Glu Ser Asn Tyr Gln Met Lys Val Val Lys

1 5 10

GGA GAT TAT GGC TAT GTT CTT GAA GAT GTT CCT CAT TTG ACT GAT TAT 219

Gly Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Glu Asp Val Pro His Leu Thr Asp Tyr

15 20 25

ATC CCT GAT CTT CCT ACT TAT GAC AAT CCA TTG CGG TCC AAT CCT GCA 267

Ile Pro Asp Leu Pro Thr Tyr Asp Asn Pro Leu Arg Ser Asn Pro Ala

30 35 40 45

TAT TCA GTT GTG AAG CAG TAC TTT GTT GAC ATG GAT GAT ACT GTC CCC 315

Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Met Asp Asp Thr Val Pro

50 55 60

CAA AAG GTT GTT CAC AAG GAC AGT CCC AGA GGG GTG CAT TTC CGG 363
Gln Lys Val Val Val His Lys Asp Ser Pro Arg Gly Val His Phe Arg
65 70 75
CGT GCT GGT CCA CGT CAG AAG GTG TAT TTC AGT TCG GAT GAT GTT CGT 411
Arg Ala Gly Pro Arg Gln Lys Val Tyr Phe Ser Ser Asp Asp Val Arg
80 85 90
GCT TGT ATT GTA ACT TGT GGT TTG TGC CCT GGG CTA AAC ACA GTG 459
Ala Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val
95 100 105
ATC AGA GAG ATT GTA CAT AGC CTC GAT TAT ATG TAT GGA GTC AAC AAA 507
Ile Arg Glu Ile Val His Ser Leu Asp Tyr Met Tyr Gly Val Asn Lys
110 115 120 125
GTC TTT GGT ATC GAT GGA GGC TAC AGG GGT TTC TAT TCC AAG AAT ATC 555
Val Phe Gly Ile Asp Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Lys Asn Ile
130 135 140
ATC AAT TTG ACA CCA AAG ACT GTT AAT GAC ATT CAT AAA CGT GGT GGT 603
Ile Asn Leu Thr Pro Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly
145 150 155
ACA ATT CTT GGA TCA TCA CGA GGA GGC CAT GAT ACC ACA AAG ATT GTT 651
Thr Ile Leu Gly Ser Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val
160 165 170
GAC AGC ATA CAG GAC CGT GAA ATT AAT CAG GTA TAT ATA ATC GGT GGT 699
Asp Ser Ile Gln Asp Arg Glu Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly
175 180 185
GAT GGA ACT CAG AAA GGA GCA GCT GTA ATA TAT GAG GAA ATC AGG CGG 747
Asp Gly Thr Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Glu Glu Ile Arg Arg
190 195 200 205
CGT GGT CTC AAA GTA ATT GTT GCT GGG ATC CCA AAG ACA ATT GAT AAT 795
Arg Gly Leu Lys Val Ile Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn

210	215	220	
GAT ATC CCT GTT ATC GAC AAG TCA TTT GGT TTT GAT ACT GCT GTA GAG			843
Asp Ile Pro Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu			
225	230	235	
GAG GCT CAA CGT GCC ATA AAT GCA GCT CAT GTT GAA GCT GAA AGT GCT			891
Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu Ser Ala			
240	245	250	
GAA AAT GGT ATT GGT GTG GTG AAG CTA ATG GGA CGC TAT AGT GGA TTC			939
Glu Asn Gly Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe			
255	260	265	
ATC GCA ATG TAT GCC ACT TTG GCG AGC AGA GAT GTT GAT CTC TGT TTA			987
Ile Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu Cys Leu			
270	275	280	285
ATT CCA GAG TCA CCC TTT TAT CTT GAA GGA GAT GGT GGA CTC TTT GAA			1035
Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu			
290	295	300	
TAC ATT GAA AAA AGG CTC AAA GAA AAT GGG CAC ATG GTT ATT GTG ATA			1083
Tyr Ile Glu Lys Arg Leu Lys Glu Asn Gly His Met Val Ile Val Ile			
305	310	315	
GCC GAA GGA GCA GGG CAA GAA CTT CTT GCA GAA GAG AAT GCG CAT GCC			1131
Ala Glu Gly Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Glu Glu Asn Ala His Ala			
320	325	330	
AAA AAC GAA CAA GAT GCT TCG GGG AAC AAG CTT CTC CAG GAT GTT GGT			1179
Lys Asn Glu Gln Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly			
335	340	345	
TTG TGG ATT TCC CAA AAA ATC AGG GAT CAT TTT GCT ACA AAA ACT AAG			1227
Leu Trp Ile Ser Gln Lys Ile Arg Asp His Phe Ala Thr Lys Thr Lys			
350	355	360	365
ATG CCC ATT ACT CTT AAG TAT ATA GAT CCG ACT TAC ATG ATT CGT GCT			1275

Met Pro Ile Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala
370 375 380
GTT CCA AGT AAT GCC TCT GAT AAT GTA TAT TGC ACT CTT CTT GCT CAA 1323
Val Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu Ala Gln
385 390 395
AGT TGT GTT CAT GGA GCA ATG GCA GGC TAC ACA GGT TTC ACC TCA GGA 1371
Ser Cys Val His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr Ser Gly
400 405 410
CTT GTC AAT GGT CGC CAG ACT TAT ATA CCA TTC AAT CGT ATT ACC GAG 1419
Leu Val Asn Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Glu
415 420 425
AAA CAA AAT ATG GTG GTT ATA ACT GAC AGG ATG TGG GCA CGT CTT CTT 1467
Lys Gln Asn Met Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu
430 435 440 445
TCG TCA ACC AAT CAG CCA AGC TTC TTG CGC GTG AAA GAC ATT GAA GAG 1515
Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Val Lys Asp Ile Glu Glu
450 455 460
ATT AAA AAG GAG GAG CAG CCG CAA ACT CAA CTG TTG GAT GGG GAT AAC 1563
Ile Lys Lys Glu Glu Gln Pro Gln Thr Gln Leu Leu Asp Gly Asp Asn
465 470 475
AAT GTA CAT GAG AAC TCA GGT CAC TGATACAGTA ATTACGAACT TGGCGTGACA 1617
Asn Val His Glu Asn Ser Gly His
480 485
CACTGAAGTA ACTCTGTTGT AATCATTGCTCTGAGCTGTTCTTGT TGTCTTGAA 1677
GCTTTGCTG CTTACCATTG TGCCCTATAA AAACAGTCCT AGGAACCTTAT TTGTTGAAGG 1737
TTTGGGATC TTCTGCATCA GATGTTGGCA GTAGTAACAG ATATATTCT GCCTAATTCA 1797
TCTAGAGTCC TAATTCTTG AAGTGAAATT AGACATCTT TTATAAAATA TTTGTAATA 1857
AATTTAAATA GTGAGAACAT TTGCTATGCA CATAAAATGAT GAACTCTGTG TGGCTGGATG 1917
GTCTTTGAG ATCTAAAATA GTCCAAGATT TTGGCAGAAA TCAGAAGTAG AGGCAGACTT 1977

T

1978

配列番号：2

配列の長さ：485

配列の種類：アミノ酸

配列

Met Gly Thr Glu Ser Asn Tyr Gln Met Lys Val Val Lys Gly Asp Tyr

1

5

10

15

Gly Tyr Val Leu Glu Asp Val Pro His Leu Thr Asp Tyr Ile Pro Asp

20

25

30

Leu Pro Thr Tyr Asp Asn Pro Leu Arg Ser Asn Pro Ala Tyr Ser Val

35

40

45

Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Met Asp Asp Thr Val Pro Gln Lys Val

50

55

60

Val Val His Lys Asp Ser Pro Arg Gly Val His Phe Arg Arg Ala Gly

65

70

75

80

Pro Arg Gln Lys Val Tyr Phe Ser Ser Asp Asp Val Arg Ala Cys Ile

85

90

95

Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile Arg Glu

100

105

110

Ile Val His Ser Leu Asp Tyr Met Tyr Gly Val Asn Lys Val Phe Gly

115

120

125

Ile Asp Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Lys Asn Ile Ile Asn Leu

130

135

140

Thr Pro Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr Ile Leu

145

150

155

160

Gly Ser Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val Asp Ser Ile

165

170

175

Gln Asp Arg Glu Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp Gly Thr

180

185

190

Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Glu Glu Ile Arg Arg Arg Gly Leu

195

200

205

Lys Val Ile Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro

210

215

220

Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln

225

230

235

240

Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu Ser Ala Glu Asn Gly

245

250

255

Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile Ala Met

260

265

270

Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu Cys Leu Ile Pro Glu

275

280

285

Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu Tyr Ile Glu

290

295

300

Lys Arg Leu Lys Glu Asn Gly His Met Val Ile Val Ile Ala Glu Gly

305

310

315

320

Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Glu Glu Asn Ala His Ala Lys Asn Glu

325

330

335

Gln Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly Leu Trp Ile

340

345

350

Ser Gln Lys Ile Arg Asp His Phe Ala Thr Lys Thr Lys Met Pro Ile

355

360

365

Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser

370

375

380

Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Cys Val

385

390

395

400

His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr Ser Gly Leu Val Asn

405

410

415

Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn
 420 425 430
 Met Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr
 435 440 445
 Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Val Lys Asp Ile Glu Glu Ile Lys Lys
 450 455 460
 Glu Glu Gln Pro Gln Thr Gln Leu Leu Asp Gly Asp Asn Asn Val His
 465 470 475 480
 Glu Asn Ser Gly His
 485

配列番号：3

配列の長さ：1778

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：フラベリアプロウニー (Flabertia brownii)

組織の種類：葉

直接の起源

ライブラリ名：緑葉mRNA由来 λ ZAP II c DNA ライブラリー

クローン名：pPFK-FB1

配列

GTAAACAAGG GGGAAAGTT ATG GAT AAT AAC ATC AGT TGT GAG ATG AAA GTT	51
Met Asp Asn Asn Ile Ser Cys Glu Met Lys Val	
1 5 10	
GAA ACA GGG GAT GCA GGC TAT GTG CTT GAA GAT GTG CCT CAC ATA ACT	99

Glu Thr Gly Asp Ala Gly Tyr Val Leu Glu Asp Val Pro His Ile Thr
 15 20 25
 GAT TAC ATC CCT AAT CTC CCT ACC TAT CCT AAT CCA TTG CGT TCT AAT 147
 Asp Tyr Ile Pro Asn Leu Pro Thr Tyr Pro Asn Pro Leu Arg Ser Asn
 30 35 40
 CCT GCA TAT TCG GTT GTG AAG CAG TAC TTT GTT GAT GCG GAT GAT ACC 195
 Pro Ala Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Ala Asp Asp Thr
 45 50 55
 GTG CCT CAA AAG GTT GTT GTA CAC AAG GAC GGT CCA AGA GGA ATA CAC 243
 Val Pro Gln Lys Val Val His Lys Asp Gly Pro Arg Gly Ile His
 60 65 70 75
 TTT CGA CGT GCT GGT CCT CGT CAA AGG GTT TAT TTT GCA CCA GAT GAA 291
 Phe Arg Arg Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Ala Pro Asp Glu
 80 85 90
 GTG CAT GCT ATA GTA ACA TGT GGT GGT TTA TGT CCT GGG CTA AAC 339
 Val His Ala Ala Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn
 95 100 105
 ACA GTG ATC AGG GAA ATT GTT TGC GCA CTT TAT CAC ATG TAT GGT GTC 387
 Thr Val Ile Arg Glu Ile Val Cys Ala Leu Tyr His Met Tyr Gly Val
 110 115 120
 ACC AAA GTT CTT GGG ATT GAT GGA GGG TAC AGA GGT TTT TAC TCA AAA 435
 Thr Lys Val Leu Gly Ile Asp Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Lys
 125 130 135
 AAC ACC ATC ACT TTG ACT CCA AAG GTT GTG AAT GAC ATC CAT AAA CGT 483
 Asn Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Val Asn Asp Ile His Lys Arg
 140 145 150 155
 GGT GGT ACA ATT ATT GGC ACC TCT CGT GGG GGC CAT GAT AAA CCA AAG 531
 Gly Gly Thr Ile Ile Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Lys Pro Lys
 160 165 170

ATA GTT GAC AGT ATT CAG GAT CGT GGT ATC AAT CAG GTT TAT ATA ATT 579
Ile Val Asp Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile
175 180 185
GGA GGA GAC GGT ACT CAA AAG GGA GCA GCT GTT ATT TAT CAG GAA GTG 627
Gly Gly Asp Gly Thr Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Gln Glu Val
190 195 200
AGA AGG CGT GGG CTT AAA GCT GTA GTG GCT GGG ATT CCT AAG ACA ATT 675
Arg Arg Arg Gly Leu Lys Ala Val Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile
205 210 215
GAT AAT GAC ATT CCG GTC ATT GAT AAG TCT TTT GGT TTT GAC ACG GCT 723
Asp Asn Asp Ile Pro Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala
220 225 230 235
GTG GAA GAG GCT CAA CGT GCC ATT AAT GCT GCA CAT GTG GAG GCT GAA 771
Val Glu Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu
240 245 250
AGT GCT GAG AAT GGC ATA GGG GTG GTC AAA CTT ATG GGA CGC TAT AGT 819
Ser Ala Glu Asn Gly Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser
255 260 265
GGA TTC ATC GCA ATG TAT GCA ACT TTG GCT AGT CGA GAT GTT GAT TTA 867
Gly Phe Ile Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu
270 275 280
TGT TTA ATT CCT GAA TCA CCT TTT TAT CTT GAG GGA GAA GGT GGA CTT 915
Cys Leu Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Glu Gly Leu
285 290 295
TTA GAA TAT GTA GAA AAA CGT CTC AAG GAC GAT GGA CAC ATG GTC ATC 963
Leu Glu Tyr Val Glu Lys Arg Leu Lys Asp Asp Gly His Met Val Ile
300 305 310 315
GTT GTA GCA GAA GGT GCT GGT CAG GAG CTG CTT GCA GCA GAA AAC TTG 1011
Val Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Ala Glu Asn Leu

320

325

330

AAA ACT TCA ACC GCA AAA GAT GCT TCT GGA AAT AAA CTA CTT CAC GAT 1059

Lys Thr Ser Thr Ala Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu His Asp

335

340

345

GTC GGA TTG TGG ATT TCT GAT AAG ATT AAG GCT CAC TTT GCT AAA ATT 1107

Val Gly Leu Trp Ile Ser Asp Lys Ile Lys Ala His Phe Ala Lys Ile

350

355

360

CCT CCC ATG CCT ATT ACT CTC AAA TAC ATA GAT CCA ACT TAC ATG ATC 1155

Pro Pro Met Pro Ile Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile

365

370

375

CGT GCG GTT CCA AGT AAT GCA TCT GAT AAT GTA TAC TGC ACT CTC CTT 1203

Arg Ala Val Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu

380

385

390

395

GCT CAA AGT TGT GTT CAT GGA GTG ATG GCG GGC TAC ACC GGC TTC ACA 1251

Ala Gln Ser Cys Val His Gly Val Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr

400

405

410

AGT GGG CTT GTC AAT GGT AGA CAG ACT TAT ATT CCA TTT AAT CGT ATC 1299

Ser Gly Leu Val Asn Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile

415

420

425

ACT GAG AAG CAG AAT AAC GTT GTG ATA ACC GAT AGG ATG TGG GCA AGG 1347

Thr Glu Lys Gln Asn Asn Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg

430

435

440

CTT CTG TCA TCC ACC AAC CAA CCA AGC TTT TTG CGA CCC CAA GAC GTT 1395

Leu Leu Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Pro Gln Asp Val

445

450

455

ATT GAA GTC CAG AAA CAA GAA CCA CCA AGT CAG TTA TTG GAT GGA 1443

Ile Glu Val Gln Lys Gln Glu Glu Pro Pro Ser Gln Leu Leu Asp Gly

460

465

470

475

GAC AGC AGC AAG CCA AAT GAC ATC TAAATCTATA AATTAAGAAT ATTGCCATT 1497

Asp Ser Ser Lys Pro Asn Asp Ile

480

TTAATGCACA AAAATAATAG CACTGCAAAT TTGGTTTGT GGATGCAATT CATCATGTT 1557
 TTGCAGAATT TTCAAGATAA AGTTGCTTAT TCTTGACTGG ATTGATCATG GATTTAAGTC 1617
 TCTTTGCAGG AATGAATTTC CCTCCAAAAA AAGAAACTGC ATAAAACCTA GTTTTGTGT 1677
 GTTGGGATCA AGCTATTGGT AGTCAAGTTA GAAAGTTAA GCTGCAGTTT GTAATTGTT 1737
 GTGTTGTTG GGTAAAGTGG CTTGTTCAT CAGAAAAAA A 1778

配列番号：4

配列の長さ：484

配列の種類：アミノ酸

配列

Met Asp Asn Asn Ile Ser Cys Glu Met Lys Val Glu Thr Gly Asp Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Val Leu Glu Asp Val Pro His Ile Thr Asp Tyr Ile Pro Asn

20 25 30

Leu Pro Thr Tyr Pro Asn Pro Leu Arg Ser Asn Pro Ala Tyr Ser Val

35 40 45

Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Ala Asp Asp Thr Val Pro Gln Lys Val

50 55 60

Val Val His Lys Asp Gly Pro Arg Gly Ile His Phe Arg Arg Ala Gly

65 70 75 80

Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Ala Pro Asp Glu Val His Ala Ala Ile

85 90 95

Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile Arg Glu

100 105 110

Ile Val Cys Ala Leu Tyr His Met Tyr Gly Val Thr Lys Val Leu Gly

115 120 125

Ile Asp Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Lys Asn Thr Ile Thr Leu

130 135 140
Thr Pro Lys Val Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr Ile Ile
145 150 155 160
Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Lys Pro Lys Ile Val Asp Ser Ile
165 170 175
Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp Gly Thr
180 185 190
Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Gln Glu Val Arg Arg Arg Gly Leu
195 200 205
Lys Ala Val Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro
210 215 220
Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln
225 230 235 240
Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu Ser Ala Glu Asn Gly
245 250 255
Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile Ala Met
260 265 270
Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu Cys Leu Ile Pro Glu
275 280 285
Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Glu Gly Leu Leu Glu Tyr Val Glu
290 295 300
Lys Arg Leu Lys Asp Asp Gly His Met Val Ile Val Val Ala Glu Gly
305 310 315 320
Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Ala Glu Asn Leu Lys Thr Ser Thr Ala
325 330 335
Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu His Asp Val Gly Leu Trp Ile
340 345 350
Ser Asp Lys Ile Lys Ala His Phe Ala Lys Ile Pro Pro Met Pro Ile
355 360 365

Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser
 370 375 380
 Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Cys Val
 385 390 395 400
 His Gly Val Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr Ser Gly Leu Val Asn
 405 410 415
 Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn
 420 425 430
 Asn Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr
 435 440 445
 Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Pro Gln Asp Val Ile Glu Val Gln Lys
 450 455 460
 Gln Glu Glu Pro Pro Ser Gln Leu Leu Asp Gly Asp Ser Ser Lys Pro
 465 470 475 480
 Asn Asp Ile

配列番号 : 5

配列の長さ : 1623

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : オリザサティバ (*Oryza sativa* L.)

品種名 : 月の光

組織の種類 : 未熟胚由来カルス

直接の起源

ライブラリー名 : カルスmRNA由来 λ ZAP II c DNA ライブラリー

クローン名 : pPFK-OS1

配列

TG GTC GCA CAC ATG CGG CAC GTC CTC GAT CTA CCG ACA TAC TCA AAT 50
 Val Val Ala His Met Arg His Val Leu Asp Leu Pro Thr Tyr Ser Asn
 1 5 10 15
 CCA CTG CAA GAT AAC CCG GCA TAC TCG GTT GTG AAG CAA TAC TTT GTA 98
 Pro Leu Gln Asp Asn Pro Ala Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val
 20 25 30
 AAC CCA GAT GAC ACT GTC TGC CAG AAG GCC ATT GTT CAC AAG GAT GGC 146
 Asn Pro Asp Asp Thr Val Cys Gln Lys Ala Ile Val His Lys Asp Gly
 35 40 45
 CCT AGA GGC AAC CAC TTC CGT CGT GCT GGG CCT CGA CAG AGG GTG TTT 194
 Pro Arg Gly Asn His Phe Arg Arg Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Phe
 50 55 60
 TTT GAA TCG GAT GAG GTC CAT GCA TGC ATT GTC ACA TGT GGA GGA CTG 242
 Phe Glu Ser Asp Glu Val His Ala Cys Ile Val Thr Cys Gly Leu
 65 70 75 80
 TGC CCT GGA CTG AAC ACT GTC ATT AGG GAA ATT GTT TGT GGC CTA AAT 290
 Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Asn
 85 90 95
 GAC ATG TAT GGT GTC AGT AGG GTA CTT GGA ATT CAG GGT GGG TAT AGA 338
 Asp Met Tyr Gly Val Ser Arg Val Leu Gly Ile Gln Gly Gly Tyr Arg
 100 105 110
 GGT TTC TAT GCT TGT AAC ACC ATT GAC TTG AGT CCA AAG AGT GTA AAC 386
 Gly Phe Tyr Ala Cys Asn Thr Ile Asp Leu Ser Pro Lys Ser Val Asn
 115 120 125
 GAC AAT CAC AAA AGG GGT GGA ACT GTT CTT GGG ACA TCA CGT GGA GGC 434
 Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr Val Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly
 130 135 140
 CAT GAC ACC ATG AAG ATT GTT GAC AGC ATC CAG GAT CGT GGT ATA AAT 482

AAT GAA ACA AAG GAA TCA ATG GGG AAA GAT GCT TCA GGC AAT TCG ATT 962
Asn Glu Thr Lys Glu Ser Met Gly Lys Asp Ala Ser Gly Asn Ser Ile
305 310 315 320
CTT CTT GAT GTT GGT CTT TGG TTA TCT CAA AAG ATA AAA GAG CAT TTC 1010
Leu Leu Asp Val Gly Leu Trp Leu Ser Gln Lys Ile Lys Glu His Phe
325 330 335
AAG AAA ATC AAG ACT ACT ATA AAT CTC AAG TAT ATA GAT CCT ACA TAC 1058
Lys Lys Ile Lys Thr Thr Ile Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr
340 345 350
ATG ATA CGT GCC ATT CCT AGC AAT GCA TCT GAC AAT GTG TAT TGC ACA 1106
Met Ile Arg Ala Ile Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr
355 360 365
CTG TTG GCA CAC AGG GTG GTT CAT GGA GCC ATG GCT GGA TAC ACT GGT 1154
Leu Leu Ala His Arg Val Val His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr GLy
370 375 380
TTC ACT GTT GGC CAA GTA AAT GGT CGG CAT TGC TAT ATC CCG TTT TAC 1202
Phe Thr Val Gly Gln Val Asn Gly Arg His Cys Tyr Ile Pro Phe Tyr
385 400 405 410
AGG ATC ACA GAG AAG CAG AAC AAA GTT TCA ATT ACT GAT AGG ATG TGG 1250
Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn Lys Val Ser Ile Thr Asp Arg Met Trp
415 420 425
GCA AGA CTT CTC TCC TCA ACC AAC CAG CCA AGT TTC CTC AGC AAG AAA 1298
Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Ser Lys
430 435 440
GAT GTG GAG GAC GCA AAG ATG GAA GAA GAG AGA GCA TCC AAG TTT TTC 1346
Asp Val Glu Asp Ala Lys Met Glu Glu Arg Ala Ser Lys Phe Phe
445 450 455
GAT GGC CCG CCT CCC AAC CCC AAG GTT GAA GAC AAA GTC GCT TCC AAT 1394
Asp Gly Pro Pro Pro Asn Pro Lys Val Glu Asp Lys Val Ala Ser Asn

460

465

470

GGC AAG GCT GTG AAG TGAGGCAGAA GGCTACTGAT CTATTATGTGC AGATGGATTA 1449
 Gly Lys Ala Val Lys

475

ATTATTACTC AATAATGTCA GTAATCTATC TATGGCTAGT GAGATGGATT AGTAAATAAT 1509
 ATTAGTATAT CTATGGCAAG TGATGCTAG CTCTTCCTGT CCAAATTAAA ATGCCGAGAA 1569
 TAGATCTCCT CTAGCAGGTT ATCGTCATTA TATTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1623

配列番号 : 6

配列の長さ : 479

配列の種類 : アミノ酸

配列

Val Val Ala His Met Arg His Val Leu Asp Leu Pro Thr Tyr Ser Asn

1

5

10

15

Pro Leu Gln Asp Asn Pro Ala Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val

20

25

30

Asn Pro Asp Asp Thr Val Cys Gln Lys Ala Ile Val His Lys Asp Gly

35

40

45

Pro Arg Gly Asn His Phe Arg Arg Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Phe

50

55

60

Phe Glu Ser Asp Glu Val His Ala Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu

65

70

75

80

Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Asn

85

90

95

Asp Met Tyr Gly Val Ser Arg Val Leu Gly Ile Gln Gly Tyr Arg

100

105

110

Gly Phe Tyr Ala Cys Asn Thr Ile Asp Leu Ser Pro Lys Ser Val Asn

115

120

125

Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr Val Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly

130 135 140
His Asp Thr Met Lys Ile Val Asp Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn
145 150 155 160
Gln Val Tyr Val Ile Gly Gly Asp Gly Thr Gln Arg Gly Ala Gly Val
165 170 175
Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly
180 185 190
Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro Val Ile Asp Arg Ser Phe
195 200 205
Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala
210 215 220
His Val Glu Ala Gly Ser Ala Glu Asn Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu
225 230 235 240
Met Gly Arg His Ser Gly Phe Ile Ala His Tyr Ala Thr Leu Ala Ser
245 250 255
Arg Asp Val Asp Cys Cys Leu Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu
260 265 270
Gly Glu Gly Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Lys Arg Leu Lys Glu Asn
275 280 285
Gly His Met Val Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Lys Leu Ile
290 295 300
Asn Glu Thr Lys Glu Ser Met Gly Lys Asp Ala Ser Gly Asn Ser Ile
305 310 315 320
Leu Leu Asp Val Gly Leu Trp Leu Ser Gln Lys Ile Lys Glu His Phe
325 330 335
Lys Lys Ile Lys Thr Thr Ile Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr
340 345 350
Met Ile Arg Ala Ile Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr
355 360 365

Leu Leu Ala His Arg Val Val His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr GLy
 370 375 380
 Phe Thr Val Gly Gln Val Asn Gly Arg His Cys Tyr Ile Pro Phe Tyr
 385 400 405 410
 Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn Lys Val Ser Ile Thr Asp Arg Met Trp
 415 420 425
 Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Ser Lys Lys
 430 435 440
 Asp Val Glu Asp Ala Lys Met Glu Glu Glu Arg Ala Ser Lys Phe Phe
 445 450 455
 Asp Gly Pro Pro Pro Asn Pro Lys Val Glu Asp Lys Val Ala Ser Asn
 460 465 470
 Gly Lys Ala Val Lys
 475

配列番号 : 7

配列の長さ : 2048

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ジーメイズ (Zea mays L.)

組織の種類 : 胚乳由来カルス

直接の起源

ライブラリー名 : カルスmRNA由来 λgt10 c DNA ライブラリー

クローン名 : pPK-ZM1

配列

CGAACCCGAA CCCTCCAAGC CGGCAGGCCG GAGCAGAGCG CGCTCCAAGC TGAATCCCCC 60

CATCTCCTAT CGCCGTCGAA AGCCGCAGGT CCATTATAAC TTTTATGAC CTTGTCTGGG 120
ATG GCT GTT GCT TTC AAA GCA AGT ACA AGT TCT GTC ACA CAG CAA CAT 168
Met Ala Val Ala Phe Lys Ala Ser Thr Ser Ser Val Thr Gln Gln His
1 5 10 15
TGG TCA AGT CCA ACA AAG GAC CAG TGT CAA TAT GGT TTC ACT CAT TTA 216
Trp Ser Ser Pro Thr Lys Asp Gln Cys Gln Tyr Gly Phe Thr His Leu
20 25 30
AGC AGG CAA AAG TGC AGA AAA AGA GCA CTG TGT GTG ACA GCT ATA TCA 264
Ser Arg Gln Lys Cys Arg Lys Arg Ala Leu Cys Val Thr Ala Ile Ser
35 40 45
GGG AAG CTA GAC CTA GAT TTC ACT GAT CCT TCT TGG AAC CAA AAG TAC 312
Gly Lys Leu Asp Leu Asp Phe Thr Asp Pro Ser Trp Asn Gln Lys Tyr
50 55 60
CAG GAA GAC TGG AAC AGG CGT TTT AGT TTG CCA CAT ATT AAT GAT ATA 360
Gln Glu Asp Trp Asn Arg Arg Phe Ser Leu Pro His Ile Asn Asp Ile
65 70 75 80
TAT GAT TTG GAA CCA AGA AGA ACT ACA TTC TCT TTG AAG AAA AAC AGA 408
Tyr Asp Leu Glu Pro Arg Arg Thr Thr Phe Ser Leu Lys Lys Asn Arg
85 90 95
ATT CCC CTG GGT GAT GGT GAT GGC TCA TCA ACT GAT ATG TGG AAC GGT 456
Ile Pro Leu Gly Asp Gly Ser Ser Thr Asp Met Trp Asn Gly
100 105 110
TAT GTA AAT AAG AAT GAT AGA GCC CTT TTG AAG GTG ATA AAG TAT GCA 504
Tyr Val Asn Lys Asn Asp Arg Ala Leu Leu Lys Val Ile Lys Tyr Ala
115 120 125
TCT CCT ACT TCT GCT GGA GCT GAG TGC ATT GAT CCT GAT TGT AGC TGG 552
Ser Pro Thr Ser Ala Gly Ala Glu Cys Ile Asp Pro Asp Cys Ser Trp
130 135 140
GTG GAA CAC TGG GTT CAT CGT GCA GGT CCT CGT AAG GAG ATA TAT TAC 600

Val Glu His Trp Val His Arg Ala Gly Pro Arg Lys Glu Ile Tyr Tys
145 150 155 160
GAA CCT GAA GAA GTA AAG GCT GCC ATT GTT ACC TGT GGA GGG CTC TGT 648
Glu Pro Glu Glu Val Lys Ala Ala Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys
165 170 175
CCT GGT CTA AAT GAT GTC ATT AGG CAG ATA GTA TTT ACT TTG GAG ACT 696
Pro Gly Leu Asn Asp Val Ile Arg Gln Ile Val Phe Thr Leu Glu Thr
180 185 190
TAT GGG GTG AAG AAT ATT GTT GGA ATC CCA TTT GGT TAT CGT GGA TTT 744
Tyr Gly Val Lys Asn Ile Val Gly Ile Pro Phe Gly Tyr Arg Gly Phe
195 200 205
TTT GAG AAA GGC TTA AAA GAA ATG CCG CTC TCG CGT GAC GTG GTG GAA 792
Phe Glu Lys Gly Leu Lys Glu Met Pro Leu Ser Arg Asp Val Val Glu
210 215 220
AAC ATA AAT CTT TCT GGA GGA AGT TTC CTA GGA GTC TCT CGT GGA GGA 840
Asn Ile Asn Leu Ser Gly Gly Ser Phe Leu Gly Val Ser Arg Gly Gly
225 230 235 240
GCT AAA ACT AGT GAG ATT GTA GAT AGC ATA CAA GCC AGA AGA ATT GAC 888
Ala Lys Thr Ser Glu Ile Val Asp Ser Ile Gln Ala Arg Arg Ile Asp
245 250 255
ATG CTA TTT GTA ATT GGT GGA AAT GGT AGC CAT GCA GGA GCT AAT GCT 936
Met Leu Phe Val Ile Gly Gly Asn Gly Ser His Ala Gly Ala Asn Ala
260 265 270
ATT CAT GAG GAG TGT CGA AAG AGA AAA CTG AAA GTT TCA GTT GTA GCA 984
Ile His Glu Glu Cys Arg Lys Arg Lys Leu Lys Val Ser Val Val Ala
275 280 285
GTC CCA AAG ACA ATT GAT AAT GAT ATA CTT TTT ATG GAT AAG ACG TTT 1032
Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Leu Phe Met Asp Lys Thr Phe
290 295 300

GGT TTT GAT ACA GCT GTA GAG AAA GCT CAG CGT GCT ATC AAT TCT GCC 1080
Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Lys Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ser Ala
305 310 315 320
TAT ATA GAG GCA CGT AGT GCA TAC CAC GGA ATT GGG TTA GTA AAA TTA 1128
Tyr Ile Glu Ala Arg Ser Ala Tyr His Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu
325 330 335
ATG GGA AGA AGT AGT GGA TTC ATA GCC ATG CAT GCT TCT CTT TCC AGT 1176
Met Gly Arg Ser Ser Gly Phe Ile Ala Met His Ala Ser Leu Ser Ser
340 345 350
GGA CAG ATT GAT GTT TGC CTG ATA CCT GAG GTA TCC TTC ACA CTT GAT 1224
Gly Gln Ile Asp Val Cys Leu Ile Pro Glu Val Ser Phe Thr Leu Asp
355 360 365
GGA GAA CAT GGT GTC TTG CGA CAC CTT GAG CAT TTA CTT AAT ACA AAG 1272
Gly Glu His Gly Val Leu Arg His Leu Glu His Leu Leu Asn Thr Lys
370 375 380
GGA TTT TGT GTG GTT TGT GTT GCT GAA GGT GCA GGG CAG GAT TTA CTC 1320
Gly Phe Cys Val Val Cys Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu
385 390 395 400
CAA AAA TCA AAT GCA ACT GAC GCT TCA GGA AAT GTG ATA CTT AGT GAC 1368
Gln Lys Ser Asn Ala Thr Asp Ala Ser Gly Asn Val Ile Leu Ser Asp
405 410 415
TTT GGT GTC CAC ATG CAG CAG AAG ATC AAG AAG CAT TTC AAG GAC ATC 1416
Phe Gly Val His Met Gln Gln Lys Ile Lys Lys His Phe Lys Asp Ile
420 425 430
GGT GTT CCC GCT GAT CTA AAA TAC ATT GAT CCA ACA TAT ATG GTT CGG 1464
Gly Val Pro Ala Asp Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Val Arg
435 440 445
GCC TGC CGG GCA AAT GCA TCT GAT GCT ATT CTC TGC ACC GTA CTT GGG 1512
Ala Cys Arg Ala Asn Ala Ser Asp Ala Ile Leu Cys Thr Val Leu Gly

450	455	460	
CAA AAT GCT GTC CAT GGA GCA TTT GCT GGG TTC AGT GGC ATC ACG TCA			1560
Gln Asn Ala Val His Gly Ala Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ile Thr Ser			
465	470	475	480
GGT GTT TGC AAC ACA CAT TAT GTC TAC CTT CCC ATC ACA GAG GTC ATT			1608
Gly Val Cys Asn Thr His Tyr Val Tyr Leu Pro Ile Thr Glu Val Ile			
485	490	495	
ACA ACA CCA AAG CAC GTC AAC CCC AAC AGC AGA ATG TGG CAC CGC TGC			1656
Thr Thr Pro Lys His Val Asn Pro Asn Ser Arg Met Trp His Arg Cys			
500	505	510	
CTC ACA TCC ACT GGC CAG CCA GAC TTC CAT TGACTACTTC ATTAACACCT			1706
Leu Thr Ser Thr Gly Gln Pro Asp Phe His			
515	520		
GAGAGCAAGG CGCCAGGAGA ATATTTAACAT CCACAAGGGA CTGCTAACAG GAACTTGAAT 1766			
AAATCTGGCT AACCCAAAAT TTTGTGAGGC TGGAGGGAGCT CATAACGAAA TTGCCAGAGC 1826			
CACCCCCCTGG TCATCCAGAC GTTGTAAGCA TGCATACCCT TTCTAGTGGT TTGCAATCCC 1886			
AAAGTAAATT AAAAGTTAGG AGTTGTTGT TCTCCAAACA ATTCAACCATA ATCCCACCAAG 1946			
CACCAAAC TG GCTCCAGCCT TGTGAGATGT TTTATTGATG ATGTAATATG CATAATAGGC 2006			
AATTGGATAT TCTTACTGGG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 2048			

配列番号 : 8

配列の長さ : 522

配列の種類 : アミノ酸

配列

Met Ala Val Ala Phe Lys Ala Ser Thr Ser Ser Val Thr Gln Gln His

1	5	10	15
---	---	----	----

Trp Ser Ser Pro Thr Lys Asp Gln Cys Gln Tyr Gly Phe Thr His Leu

20	25	30
----	----	----

Ser Arg Gln Lys Cys Arg Lys Arg Ala Leu Cys Val Thr Ala Ile Ser

85 40 45

Gly Lys Leu Asp Leu Asp Phe Thr Asp Pro Ser Trp Asn Gln Lys Tyr
50 55 60

Gln Glu Asp Trp Asn Arg Arg Phe Ser Leu Pro His Ile Asn Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Asp Leu Glu Pro Arg Arg Thr Thr Phe Ser Leu Lys Lys Asn Arg
85 90 95

Ile Pro Leu Gly Asp Gly Ser Ser Thr Asp Met Trp Asn Gly
100 105 110

Tyr Val Asn Lys Asn Asp Arg Ala Leu Leu Lys Val Ile Lys Tyr Ala
115 120 125

Ser Pro Thr Ser Ala Gly Ala Glu Cys Ile Asp Pro Asp Cys Ser Trp
130 135 140

Val Glu His Trp Val His Arg Ala Gly Pro Arg Lys Glu Ile Tyr Tys
145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Val Lys Ala Ala Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys
165 170 175

Pro Gly Leu Asn Asp Val Ile Arg Gln Ile Val Phe Thr Leu Glu Thr
180 185 190

Tyr Gly Val Lys Asn Ile Val Gly Ile Pro Phe Gly Tyr Arg Gly Phe
195 200 205

Phe Glu Lys Gly Leu Lys Glu Met Pro Leu Ser Arg Asp Val Val Glu
210 215 220

Asn Ile Asn Leu Ser Gly Gly Ser Phe Leu Gly Val Ser Arg Gly Gly
225 230 235 240

Ala Lys Thr Ser Glu Ile Val Asp Ser Ile Gln Ala Arg Arg Ile Asp
245 250 255

Met Leu Phe Val Ile Gly Gly Asn Gly Ser His Ala Gly Ala Asn Ala
260 265 270

Ile His Glu Glu Cys Arg Lys Arg Lys Leu Lys Val Ser Val Val Ala
275 280 285
Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Leu Phe Met Asp Lys Thr Phe
290 295 300
Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Lys Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ser Ala
305 310 315 320
Tyr Ile Glu Ala Arg Ser Ala Tyr His Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu
325 330 335
Met Gly Arg Ser Ser Gly Phe Ile Ala Met His Ala Ser Leu Ser Ser
340 345 350
Gly Gln Ile Asp Val Cys Leu Ile Pro Glu Val Ser Phe Thr Leu Asp
355 360 365
Gly Glu His Gly Val Leu Arg His Leu Glu His Leu Leu Asn Thr Lys
370 375 380
Gly Phe Cys Val Val Cys Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu
385 390 395 400
Gln Lys Ser Asn Ala Thr Asp Ala Ser Gly Asn Val Ile Leu Ser Asp
405 410 415
Phe Gly Val His Met Gln Gln Lys Ile Lys Lys His Phe Lys Asp Ile
420 425 430
Gly Val Pro Ala Asp Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Val Arg
435 440 445
Ala Cys Arg Ala Asn Ala Ser Asp Ala Ile Leu Cys Thr Val Leu Gly
450 455 460
Gln Asn Ala Val His Gly Ala Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ile Thr Ser
465 470 475 480
Gly Val Cys Asn Thr His Tyr Val Tyr Leu Pro Ile Thr Glu Val Ile
485 490 495
Thr Thr Pro Lys His Val Asn Pro Asn Ser Arg Met Trp His Arg Cys

58

500

505

510

Leu Thr Ser Thr Gly Gln Pro Asp Phe His

515

520

配列番号 : 9

配列の長さ : 1558

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ラファナスサティバス (Raphanus sativus L.)

組織の種類 : 葉

直接の起源

ライブラリー名 : 緑葉RNA 由来 λ ZAP II cDNA ライブラリー

クローン名 : pPFK-RS1

配列

TCT GTT GTT AAG CAG TAC TTC GTT GAT GAG GAT GAC ACG	GTT CCT CAG	48
Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Glu Asp Asp Thr Val	Pro Gln	
1	5	10
AAG ATC GTT GTT CAT CCT GAT AGT CCA AGA GGA ACA CAT TTC CGC	AGA	96
Lys Ile Val Val His Pro Asp Ser Pro Arg Gly Thr His Phe	Arg Arg	
20	25	30
GCA GGA CCA CGT CAA AGG GTT TAC TTT GAT TCG GAT GAT GTT GCG		144
Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Val Val Ala		
35	40	45
TGC ATT GTT ACA TGT GGT GGC TTG TGT CCA GGG CTT AAT ACT GTC ATC		192
Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cyc Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile		

58

500

505

510

Leu Thr Ser Thr Gly Gln Pro Asp Phe His

515

520

配列番号 : 9

配列の長さ : 1558

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ラファナスサティバス (Raphanus sativus L.)

組織の種類 : 葉

直接の起源

ライブラリー名 : 緑葉RNA 由来 λ ZAP II cDNA ライブラリー

クローン名 : pPKF-RS1

配列

TCT	GTT	AAG	CAG	TAC	TTC	GTT	GAT	GAG	GAT	GAC	ACG	GTT	CCT	CAG	48	
Ser	Val	Val	Lys	Gln	Tyr	Phe	Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Thr	Val	Pro	Gln	
1	5						10					15				
AAG	ATC	GTT	GTT	CAT	CCT	GAT	AGT	CCA	AGA	GGA	ACA	CAT	TTC	CGC	AGA	96
Lys	Ile	Val	Val	His	Pro	Asp	Ser	Pro	Arg	Gly	Thr	His	Phe	Arg	Arg	
20		5					25					30				
GCA	GGA	CCA	CGT	CAA	AGG	GTT	TAC	TTT	GAT	TCG	GAT	GAT	GTT	GCG	144	
Ala	Gly	Pro	Arg	Gln	Arg	Val	Tyr	Phe	Asp	Ser	Asp	Asp	Val	Val	Ala	
35							40					45				
TGC	ATT	GTT	ACA	TGT	GGT	GGC	TTG	TGT	CCA	GGG	CTT	AAT	ACT	GTC	ATC	192
Cys	Ile	Val	Thr	Cys	Gly	Gly	Leu	Cyc	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Val	Ile	

50	55	60	
AGA GAA ATC GTT TGT GGA TTG TCT TAC ATG TAT GGT GTC AAG AAA ATC			240
Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Val Lys Lys Ile			
65	70	75	
CTT GGC ATT GAG GGA GGT TAC AGA GGC TTC TAC GCT AGG AAC ACG ATC			288
Leu Gly Ile Glu Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ala Arg Asn Thr Ile			
80	85	90	
GAT TTG GAT TTG AAA ACA GTG AAT GAT ATT CAT AAA CGT GGA GGA ACC			336
Asp Leu Asp Leu Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr			
95	100	105	
ATC CTC GGG ACT TCA AGA GGT GGT CAC GAC ACT ACT AAG ATA GTT GAT			384
Ile Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val Asp			
110	115	120	
AGT ATT CAA GAT CGT GGG ATT AAC CAG GTT TAT ATA ATC GGT GGA GAT			432
Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp			
125	130	135	
GGA TCA CAG AAA GGA GCA GCT GTT ATA TTC GAG GAG ATT AGG AGA CGT			480
Gly Ser Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg			
140	145	150	155
GGA CTC AAA GTT GCT GTT GCA GGG ATC CCC AAA ACA ATC GAC AAT GAC			528
Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp			
160	165	170	
ATT CCT ATT ATC GAT AGA TCG TTC GGG TTT GAC ACA GCT GTA GAA GAG			576
Ile Pro Ile Ile Asp Arg Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu			
175	180	185	
GCT CAA CGT GCT ATC AAC GCA GCT CAT GTG GAA GCT ACA AGT TTT GAG			624
Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Thr Ser Phe Glu			
190	195	200	
AAT GGT ATT GGT CTT GTC AAG TTA ATG GGA CGT TAT AGT GGA TTC ATT			672

Asn	Gly	Ile	Gly	Leu	Val	Lys	Leu	Met	Gly	Arg	Tyr	Ser	Gly	Phe	Ile	
205				210					215							
GCG	ATG	TAT	GCA	ACA	CTA	GCC	AGC	AGA	GAC	GTG	GAC	TGC	TGC	TTG	ATC	720
Ala	Met	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Ser	Arg	Asp	Val	Asp	Cys	Cys	Leu	Ile	
220				225					230						235	
CCG	GAA	TCT	CCA	TTT	TTT	CTT	GAA	GGC	AAA	GGC	GGT	CTT	TTC	GAG	TTT	768
Pro	Glu	Ser	Pro	Phe	Phe	Leu	Glu	Gly	Lys	Gly	Gly	Leu	Phe	Glu	Phe	
240				245					245						250	
ATC	GGT	AAA	CGG	CTA	AAG	GAG	ATT	GGT	CAC	ATG	GTG	ATT	GTG	ATA	GCA	816
Ile	Gly	Lys	Arg	Leu	Lys	Glu	Ile	Gly	His	Met	Val	Ile	Val	Ile	Ala	
255				260					265							
GAA	GGT	GCT	GGA	CAA	GAT	CTG	TTG	GCT	GAA	AGC	AAT	GAA	CAG	TCC	ACA	864
Glu	Gly	Ala	Gly	Gln	Asp	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Asn	Glu	Gln	Ser	Thr	
270				275					280							
ACC	CTC	AAA	GAT	GCA	TCT	GGG	AAC	AAA	CTT	CTA	CAA	GAC	GTT	GGC	CTA	912
Thr	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Asn	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	Val	Gly	Leu	
285				290					295							
TGG	ATC	TCC	CAA	CGG	ATC	AAG	GAT	CAT	TTT	GCC	AAG	AAG	ATG	ACC	CTA	960
Trp	Ile	Ser	Gln	Arg	Ile	Lys	Asp	His	Phe	Ala	Lys	Lys	Met	Thr	Leu	
300				305					310						315	
AAC	CTG	AAA	TAC	ATA	GAT	CCA	ACC	TAC	ATG	ATA	AGG	GCT	GTT	CCG	AGC	1008
Asn	Leu	Lys	Tyr	Ile	Asp	Pro	Thr	Tyr	Met	Ile	Arg	Ala	Val	Pro	Ser	
320				325					325						330	
AAT	GCA	TCA	GAC	AAT	GTA	TGC	ACG	CTG	TTA	GCT	CAA	AGC	GCG	GTT		1056
Asn	Ala	Ser	Asp	Asn	Val	Cys	Cys	Thr	Leu	Leu	Ala	Gln	Ser	Ala	Val	
335				340					340						345	
CAT	GGA	GTG	ATG	GCT	GGT	TAC	AAT	GGC	TTC	ACC	GTT	GGT	CTT	GTT	AAT	1104
His	Gly	Val	Met	Ala	Gly	Tyr	Asn	Gly	Phe	Thr	Val	Gly	Leu	Val	Asn	
350				355					355						360	

GGC AGA CAT ACT TAC ATT CCC TTC TAT AGG ATC ACT GAG AAA CAG AAC 1152
 Gly Arg His Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn
 365 370 375
 AAG GTG GTG ATC ACT GAC AGA ATG TGG GCA AGG CTT TTG TCT TCG ACA 1200
 Lys Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr
 380 385 390 395
 AAC CAG CCT AGT TTC ATG AAG CAC GAT GAT CAC CAC GAG CCA AAC CAT 1248
 Asn Gln Pro Ser Phe Met Lys His Asp Asp His His Glu Pro Asn His
 400 405 410
 TCT GGT GGT GAA GCA GGT GCC ATG AAC TGG TGAAACAAC TTTGTCTGAC 1298
 Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ala Met Asn Trp
 415 420
 AATCATTTG TTTGAGAAAAG AAAGTAAGGT TTCTTTATTT TGATAGAAGC TTCTCAAAT 1358
 GTTTTATAAA TCTTTCTTCA AGCAAAAGAG AAAGAGAGAG ATATACATT CCTCCTTGGA 1418
 GAAGTTCTATA CAGTTATAAT TGTGATAAAAT CCATGTATTA AACTTTGGAG AGTGATCTG 1478
 CACTTGCCAA ACTGTAATT ACACTTTAT AATAACAAAT CTATAAGGAA ATGTTTGTT 1538
 TCAAAAAAAA AAAAAAAA 1558

配列番号 : 10

配列の長さ : 421

配列の種類 : アミノ酸

配列

Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Glu Asp Asp Thr Val Pro Gln
 1 5 10 15
 Lys Ile Val Val His Pro Asp Ser Pro Arg Gly Thr His Phe Arg Arg
 20 25 30
 Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Val Val Ala
 35 40 45
 Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cyc Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile

50

55

60

Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Val Lys Lys Ile

65

70

75

Leu Gly Ile Glu Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ala Arg Asn Thr Ile

80

85

90

Asp Leu Asp Leu Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr

95

100

105

Ile Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val Asp

110

115

120

Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp

125

130

135

Gly Ser Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg

140

145

150

155

Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp

160

165

170

Ile Pro Ile Ile Asp Arg Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu

175

180

185

Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Thr Ser Phe Glu

190

195

200

Asn Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile

205

210

215

Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Cys Cys Leu Ile

220

225

230

235

Pro Glu Ser Pro Phe Phe Leu Glu Gly Lys Gly Gly Leu Phe Glu Phe

240

245

250

Ile Gly Lys Arg Leu Lys Glu Ile Gly His Met Val Ile Val Ile Ala

255

260

265

Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu Ala Glu Ser Asn Glu Gln Ser Thr

270

275

280

Thr Leu Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly Leu
 285 290 295
 Trp Ile Ser Gln Arg Ile Lys Asp His Phe Ala Lys Lys Met Thr Leu
 300 305 310 315
 Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser
 320 325 330
 Asn Ala Ser Asp Asn Val Cys Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Ala Val
 335 340 345
 His Gly Val Met Ala Gly Tyr Asn Gly Phe Thr Val Gly Leu Val Asn
 350 355 360
 Gly Arg His Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn
 365 370 375
 Lys Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr
 380 385 390 395
 Asn Gln Pro Ser Phe Met Lys His Asp Asp His His Glu Pro Asn His
 400 405 410
 Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ala Met Asn Trp
 415 420

配列番号: 11

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Arg Ala Gly Pro Arg

1 5

配列番号: 12

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

配列

Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn

1

5

10

配列番号: 13

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Gly Tyr Arg Gly Phe

1

5

配列番号: 14

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Ile Val Asp Ser Ile Gln

1

5

配列番号: 15

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

配列

Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile

1

5

配列番号: 16

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

配列

Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu

1 5

配列番号: 17

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Ala Gln Arg Ala Ile Asn

1 5

配列番号: 18

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Val Lys Leu Met Gly Arg

1 5

配列番号: 19

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Ser Gly Phe Ile Ala

1 5

配列番号: 20

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Ala Glu Gly Ala Gly Gln

1

5

配列番号: 21

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Asp Ala Ser Gly Asn

1

5

配列番号: 22

配列の長さ: 9

配列の型: アミノ酸

配列

Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met

1

5

配列番号: 23

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Cys Leu Ile Pro Glu

1

5

請求の範囲

1. 植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするDNA。
2. 5℃でのQ₁₀値が2.4以下である植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードする請求項1記載のDNA。
3. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
4. 配列表の配列番号1で示される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
5. 配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
6. 配列表の配列番号3で示される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
7. 配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
8. 配列表の配列番号5で示される塩基配列を有する請求項7記載のDNA。
9. 配列表の配列番号8で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
10. 配列表の配列番号7で示される塩基配列を有する請求項9記載のDNA。
11. 配列表の配列番号10で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
12. 配列表の配列番号9で示される塩基配列を有する請求項11記載のDNA。
13. 配列表の配列番号11で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
14. 配列表の配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
15. 配列表の配列番号21で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
16. 配列表の配列番号22で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
17. 配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸又はその一部をコードするDNA及び配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むDNAのいずれかと試料DNAとをハイブリダイズさせることから成る、植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランス

フェラーゼ遺伝子の検出方法。

18. 配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸又はその一部をコードするDNA及び配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むDNAのいずれかをPCRのためのプライマーとして用いて植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼ遺伝子を増幅する方法。

19. 請求項1ないし12のいずれか1項に記載のDNAを含み、宿主細胞内で植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼを発現することができる組換えベクター。

20. 請求項19記載の組換えベクターで植物を形質転換することから成る、低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法。

21. 前記植物はバレイショである請求項20記載の方法。

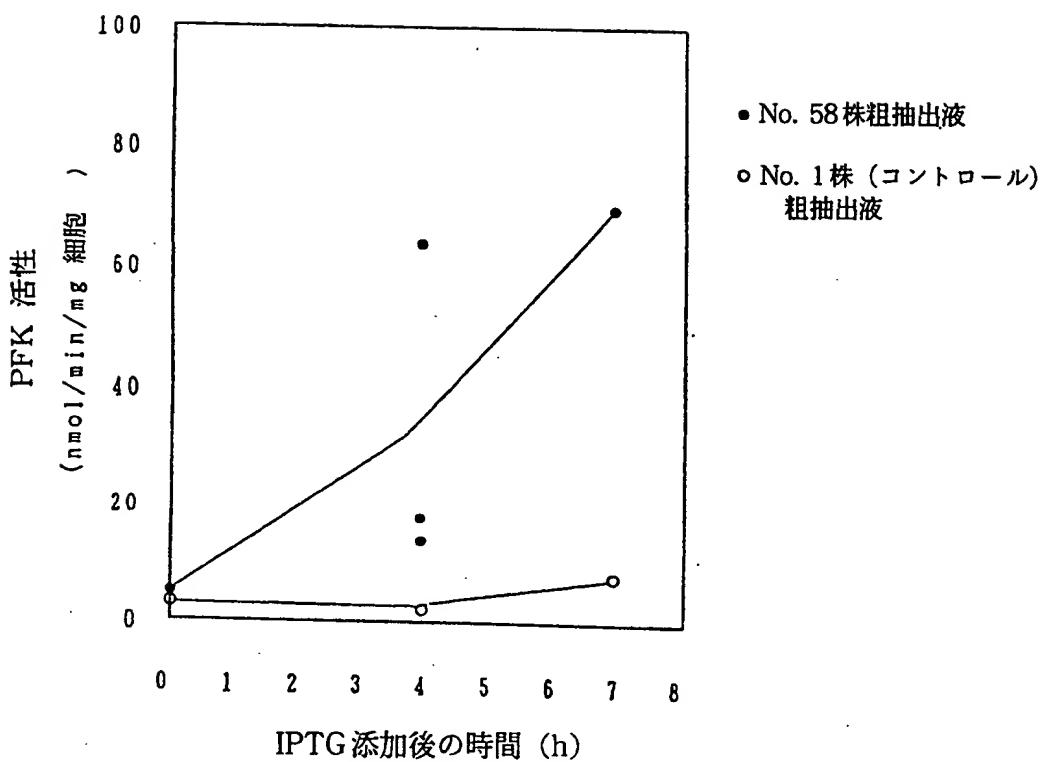


図1

2/6

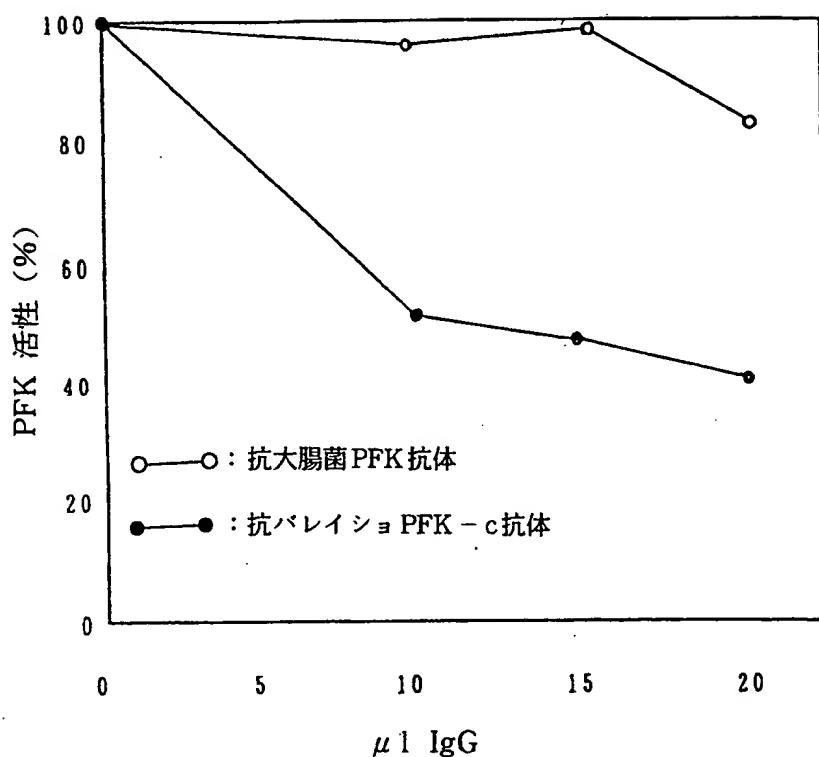


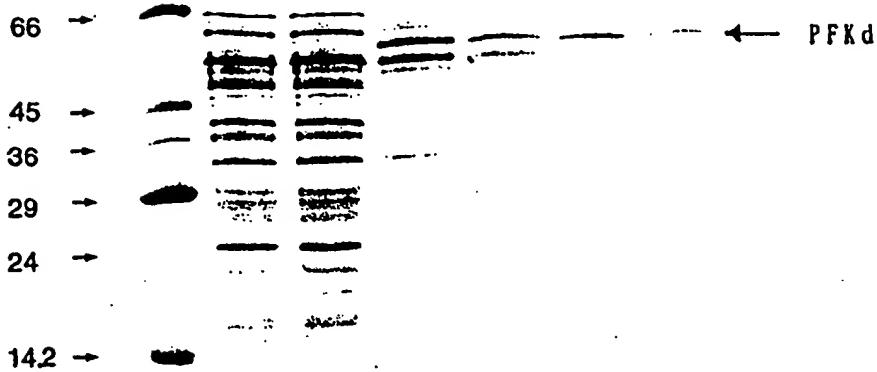
図 2

A : CBB染色

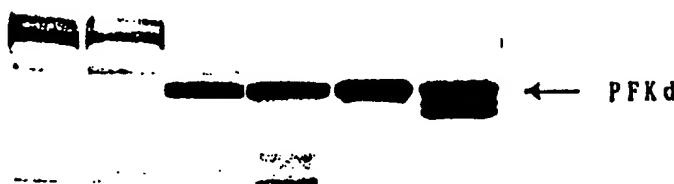
BEST AVAILABLE COPY

1 2 3 4 5 6 7

キロダルトン

B: ウェスタンプロット解析
(抗バレイショ PFK - c抗体)

1 2 3 4 5 6 7



レーン 1 : 分子量マーカー

2,3 : 大腸菌 XL1 - Blue 粗抽出液

4 : シバクロンブルー アガロース精製後 (フロースルー)

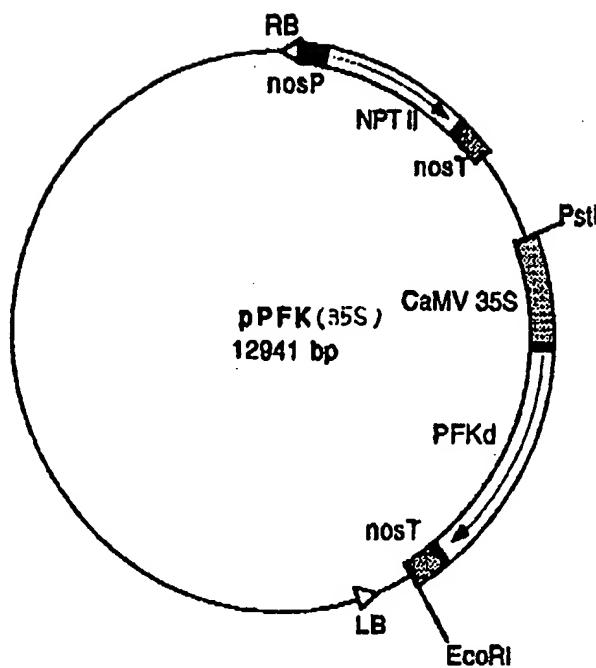
5 : リアクティブレッド 120 - アガロース精製後 (KCl 溶出)

6 : モノQ 精製後

7 : バレイショ 塊茎から精製した PFK

図 3

BEST AVAILABLE COPY



RB, LB: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのT-DNAの左右境界領域

nosP: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノバリンシンターゼ遺伝子のプロモーター (0.3 kb)

NPTII: カナマイシン抵抗性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (1.2 kb)

nosT: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノバリンシンターゼのポリアデニレーションシグナル (0.3 kb)

CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター (0.8 kb)

PFKd: バレイショ品種Brodickの低温耐性PFK遺伝子 (1.8 kb)

図4

BEST AVAILABLE COPY

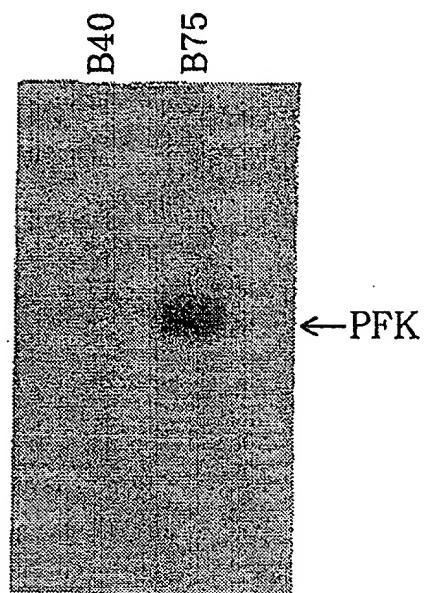


図5

差替え用紙(規則26)

BEST AVAILABLE COPY

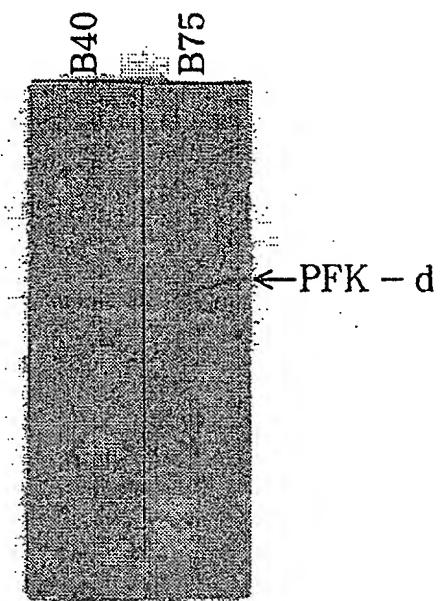


図6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12N15/55, C12N9/12, C12N15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. Biol. Chem., Vol. 26, No. 30, (1990) Sara M. Carlisle et al. "Pyrophosphate-dependent Phosphofructokinase", P. 18366-18371	1, 19, 20
X	Plant. Physiol., Vol. 99, No. 3, (1992) Blakeley S.D. et al. "Expression of the genes for the alpha and beta-subunits of pyrophosphate-dependent, phosphofructokinase in germinating and developing seeds from Ricinus-Communis", P. 1245-1250	1, 19, 20
A	Planta, Vol. 180, No. 4, (1990) Hammond J.B.W. et al. "Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from Potato tubers", P. 613-616	2, 20, 21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 1, 1994 (01. 11. 94)

Date of mailing of the international search report

November 22, 1994 (22. 11. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl^a C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl^b C12N15/55, C12N9/12, C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J. Biol. Chem., 第265巻, 第30号, (1990) Sara M. Carlisle et al. [Pyrophosphate-dependent Phosphofructokinase] p.18366-18371	1, 19, 20
X	Plant. Physiol., 第99巻, 第3号, (1992) Blakeley S. D et al. [Expression of the genes for the alpha and beta-subunits of phrophosphate-dependent phosphofructo-	1, 19, 20

 C欄の続きにも文献が例挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当事者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 11. 94

国際調査報告の発送日

22.11.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

種 村 慶 樹

4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文獻の カテゴリー	引用文獻名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	kinase in germinating and developing seeds from Ricinus-Communis] p.1245-1250	
A	Planta, 第180巻, 第4号, (1990) Hammond J. B. W. et al. [Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from Potato tubers] p.613-616	2, 20, 21

BEST AVAILABLE IMAGE